



(19)

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



A20

(11)

EP 1 006 192 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

- (43) Veröffentlichungstag:
07.06.2000 Patentblatt 2000/23
- (21) Anmeldenummer: 99122650.7
- (22) Anmeldetag: 13.11.1999

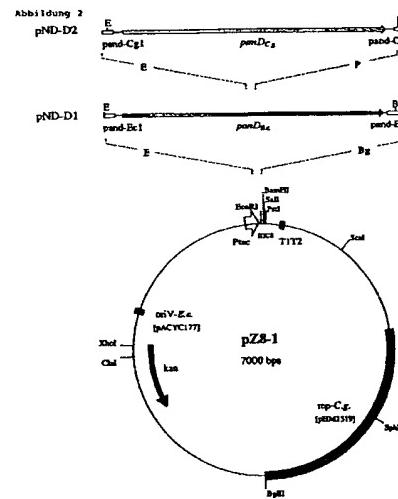
(51) Int. Cl.⁷: C12N 15/60, C12N 15/54,
C12N 15/77, C12P 13/02
// C12N1/21, (C12R1/15, 1:19)

- (84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI
- (30) Priorität: 01.12.1998 DE 19855313
- (71) Anmelder:
Degussa-Hüls Aktiengesellschaft
60287 Frankfurt am Main (DE)

- (72) Erfinder:
- Dusch, Nicole, Dr.
33619 Bielefeld (DE)
 - Kalinowski, Jörn, Dr.
33615 Bielefeld (DE)
 - Pühler, Alfred, Prof. Dr.
33739 Bielefeld (DE)

(54) **Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenäsäure durch Verstärkung des panD-Gens in Mikroorganismen**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothenäsäure durch Fermentation von Mikroorganismen, in denen zumindest das panD-Gen verstärkt (überexprimiert) wird, gegebenfalls in Kombination mit dem panB- und/oder panC-Gen, und Anreicherung der Pantothenäsäure im Medium oder den Zellen der Mikroorganismen.



EP 1 006 192 A2

EP 1 006 192 A2

Beschreibung

Stand der Technik

- 5 [0001] Die Pantothenensäure stellt ein kommerziell bedeutendes Vitamin dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet.
- [0002] Pantothenensäure kann durch chemische Synthese oder biotechnisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährösungen hergestellt werden. Bei der chemischen Synthese ist das DL-Pantolacton eine wichtige Zwischenstufe. Es wird in einem mehrstufigen Verfahren aus Formaldehyd, Isobutylaldehyd und Cyanid 10 hergestellt. In weiteren Verfahrensschritten wird das racemische Gemisch aufgetrennt und D-Pantolacton mit β -Alanin kondensiert und man erhält D-Pantothenensäure.
- [0003] Der Vorteil der fermentativen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der direkten Bildung der gewünschten stereoisomeren D-Form die frei von L-Pantothenensäure ist.
- [0004] Verschiedene Arten von Bakterien, wie z. B. Escherichia coli, Arthrobacter ureafaciens, Corynebacterium 15 erythrogenes, Brevibacterium ammoniagenes und auch Hefen, wie z. B. Debaromyces castellii können wie in EP-A 0 493 060 gezeigt, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, D-Pantothenensäure produzieren. EP-A 0 493 060 zeigt weiterhin, daß bei Escherichia coli durch Amplifikation von Pantothenensäure-Biosynthesege- 20 nen aus E.coli, die auf den Plasmiden pFV3 und pFV5 enthalten sind, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, die Bildung von D-Pantothenensäure verbessert wird.
- [0005] EP-A 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 beschreiben von Escherichia coli Stamm IFO3547 abgeleitete Mutanten wie FV5714, FV525, FV814, FV521, FV221, FV6051 und FV5069 die Resistzenzen gegen verschiedene Antimetabolite wie Salizylsäure, α -Ketobuttersäure, β -Hydroxyasparaginsäure, O-Methylthreonin und α -Ketoisovaleriansäure tragen und in einer Nährlösung, die Glucose enthält Pantoinsäure und in einer Nährlösung, die Glucose und β -Alanin enthält, D-Pantothenensäure produzieren. In EPA 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 wird weiterhin gezeigt, daß 25 nach Amplifikation der Pantothenensäure-Biosynthesegegen, die auf dem Plasmid pFV31 enthalten sind, in den oben genannten Stämmen in einer Nährlösung die Glucose enthält die Produktion von D-Pantoinsäure und in einer Nährlösung die Glucose und β -Alanin enthält die Produktion von D-Pantothenensäure verbessert wird.
- [0006] In WO 97/10340 wird darüber hinaus gezeigt, daß in Pantothenensäure bildenden Stämmen von Escherichia coli durch Erhöhung der Aktivität des Enzyms Acetohydroxysäure-Synthase II, einem Enzym der Valin Biosynthese, die 30 Pantothenensäure-Produktion weiter gesteigert werden kann.

Aufgabe der Erfindung

- 35 [0007] Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen Herstellung von Pantothenensäure bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 40 [0008] Das Vitamin Pantothenensäure stellt ein kommerziell bedeutendes Produkt dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran neue Verfahren zur Herstellung von Pantothenensäure bereitzustellen.
- [0009] Wenn im Folgenden D-Pantothenensäure oder Pantothenensäure oder Pantothenat erwähnt werden, sind damit nicht nur die freien Säuren, sondern auch die Salze der D-Pantothenensäure wie z.B. das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz gemeint.
- 45 [0010] Gegenstand der Erfindung ist unter anderem ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenensäure unter Verwendung von Mikroorganismen, die insbesondere bereits D-Pantothenensäure produzieren, und in denen das für die L-Aspartat-1-Decarboxylase (E.C. 4.1.1.11) kodierende panD-Gen einzeln oder in Kombination mit den Genen panB und/oder panC verstärkt, insbesondere überexprimiert wird. Die Erfindung betrifft weiter entsprechende rekombinante DNA-Sequenzen, wie sie in den Ansprüchen niedergelegt sind. Gegenstand der Erfindung sind ebenso 50 Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothenensäure, die unter Verwendung der gemäß den Ansprüchen 8 bis 17 hergestellten, verbesserten, D-Pantothenensäure erzeugenden Mikroorganismen durchgeführt werden.
- [0011] Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.
- 55 [0012] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Pantothenensäure aus Glu- cose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen.

Es kann sich um Pilze oder Hefen oder Gram-positive Bakterien z. B. der Gattung Corynebacterium oder um Gram-negative Bakterien wie z. B. die der Enterobacteriaceae handeln. Bei der Familie der Enterobacteriaceae ist besonders die Gattung Escherichia mit der Art Escherichia coli zu nennen. Innerhalb der Art Escherichia coli sind die sogenannten K-12 Stämme wie z. B. die Stämme MG1655 oder W3110 (Neidhard et al.: *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology* (ASM Press, Washington D.C.)) oder der Escherichia coli Wildtypstamm IFO3547 (Institut für Fermentation, Osaka, Japan) und davon abgeleitete Mutanten zu nennen. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist Aminosäuren zu produzieren. Zu dieser Art gehören Wildtypstämme wie z. B. *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 und davon abgeleitete Mutanten.

[0013] Die Erfinder fanden heraus, daß Mikroorganismen nach Überexpression des neuen für die L-Aspartat-1-Decarboxylase (E.C. 4.1.1.11) kodierenden panD-Gens, insbesondere aus *Corynebacterium glutamicum* in verbesserter Weise Pantotheninsäure produzieren.

[0014] Die Erfinder haben darüberhinaus herausgefunden, daß die Überexpression des panD-Gens sich in Stämmen vorteilhaft auswirkt, in denen zusätzlich die für Ketopantoathydroxymethyltransferase und Pantothenatsynthetase kodierenden Gene panB und panC einzeln oder gemeinsam überexprimiert vorliegen.

[0015] Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen D-Pantothenatbildung zu steigern.

Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzyms ebenso die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

[0016] Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (*Bio/Technology* 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (*Gene* 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (*Bio/Technology* 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (*Gene* 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (*Bio/Technology* 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (*Applied and Environmental Microbiology* 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (*Journal of Bacteriology* 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Jensen und Hammer (*Biotechnology and Bioengineering* 58, 191-195 (1998)) oder im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“ der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981). Darüberhinaus findet der Fachmann unter anderem Anleitungen bei Chang und Cohen (*Journal of Bacteriology* 134:1141-1156 (1978)), bei Hartley und Gregori (*Gene* 13:347-353 (1981)), bei Amann und Brosius (*Gene* 40:183-190 (1985)), bei de Broer et al. (*Proceedings of the National of Sciences of the United States of America* 80:21-25 (1983)), bei LaVallie et al. (*BIO/TECHNOLOGY* 11, 187-193 (1993)), in PCT/US97/13359, bei Llosa et al. (*Plasmid* 26:222-224 (1991)), bei Quandt und Klipp (*Gene* 80:161-169 (1989)), bei Hamilton (*Journal of Bacteriology* 171:4617-4622 (1989)), bei Makrides (*Microbiological Reviews* 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

[0017] Zur Isolierung des panD-Gens oder anderer Gene wie z.B. der Gene panB und panC von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (*Cell* 50, 495 - 508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (*Molecular and General Genetics*, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, *Nucleic Acids Research* 16:1563-1575) angelegt wurde. Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Viera et al., 1982, *Gene*, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirt eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mr, der von Grant et al. (*Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die Genbank wird anschließend in einen Indikatorstamm durch Transformation (Hanahan, *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580, 1983) oder Elektroporation (Tauch et.al., 1994, *FEMS Microbiological Letters*, 123:343-347) eingebaut. Der Indikatorstamm zeichnet sich dadurch aus, dass er eine Mutation in dem interessierenden Gen besitzt, die einen detektierbaren Phänotyp z.B. eine Auxotrophie hervorruft. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die *E. coli* Mutante DV9 (Vallari und Rock, *Journal of Bacteriology* 1985, 164:136-142), die eine Mutation im panD-Gen trägt von

EP 1 006 192 A2

besonderem Interesse. Ein anderes Beispiel für eine Pantotheninsäure-bedürftige *E. coli* Mutante ist der Stamm SJ2, der eine Mutation im panB-Gen trägt und vom Genetic Stock Center der Yale University (New Haven, Connecticut, USA) bezogen werden kann. Nach Transformation des Indikatorstammes wie z.B. der panD-Mutante DV9 mit einem rekombinanten Plasmid, welches das interessierende Gen wie z.B. das panD-Gen trägt und Expression des betreffenden Gens, wird der Indikatorstamm bezüglich der entsprechenden Eigenschaft wie z.B. der Pantotheninsäure-Bedürftigkeit prototroph. Das dergestalt isolierte Gen bzw. DNA-Fragment kann durch Bestimmung der Sequenz, wie z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben, charakterisiert werden. Anschließend kann der Grad an Identität zu bekannten Genen, die in Datenbanken wie z.B. der GenBank (Benson et al., 1998, Nucleic Acids Research, 26:1-7) enthalten sind, mit publizierten Methoden (Alt-schul et al., 1990, Journal of Molecular Biology 215:403-410) analysiert werden.

[0018] Auf diese Weise wurde die neue für das Gen panD kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurden aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenzen der entsprechenden Enzyme abgeleitet. In SEQ ID NO 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des panD-Genproduktes nämlich der L-Aspartat-1-Decarboxylase dargestellt. Weiterhin wurde auf diese Weise die neue für die Gene panB und panC kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 3 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. In SEQ ID NO 4 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des panB-Genproduktes nämlich der ketopantoathydroxymethyltransferase dargestellt und in SEQ ID NO 5 die sich ergebende Aminosäuresequenz des panC-Genproduktes nämlich der Pantothenatsynthetase dargestellt.

[0019] Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 3 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 3 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konervative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4 und/oder SEQ ID NO 5 ergeben sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

[0020] Das auf diese Weise charakterisierte Gen kann anschließend einzeln oder in Kombination mit anderen in einem geeigneten Mikroorganismus zur Expression gebracht werden. Eine bekannte Methode Gene zu exprimieren bzw. überzuexprimieren besteht darin diese mit Hilfe von Plasmidvektoren zu amplifizieren, die überdies mit Expressionsignalen ausgestattet sein können. Als Plasmidvektoren kommen solche in Frage, die in den entsprechenden Mikroorganismen replizieren können. Für *Escherichia coli* kommen z.B. die Vektoren pSC101 (Vocke and Bastia, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80,(21), 6557-6561 (1983)) oder pKK223-3 (Brosius and Holy, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81, 6929 (1984)), für *Corynebacterium glutamicum* z.B. der Vektor pEKEEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) für die vorliegende Erfindung in Frage. Beispiele für derartige Mikroorganismen sind die *C. glutamicum*-Stämme ATCC13032/pND-D2 und ATCC13032/pND-DBC2 und der *E. coli*-Stamm MG1655/pND-D2, die die Plasmide pND-D2 und pND-DBC2 enthalten. Plasmid pND-D2 ist ein auf dem Plasmid pZ8-1 basierender *E. coli*-*C. glutamicum* Pendelvektor der das panD-Gen von *C. glutamicum* trägt. Plasmid pND-DBC2 ist ein auf dem Plasmid pZ8-1 basierender *E. coli*-*C. glutamicum* Pendelvektor der die Gene panD, panB und panC von *C. glutamicum* trägt.

[0021] Es ist dem Fachmann klar, daß chromosomal Mutationen, die Resistenz gegen Metabolite und Antimetabolite bewirken oder die das Abfließen von Vorstufen der Pantotheninsäure verhindern, in vorteilhafter Weise mit den Massnahmen die Gegenstand der Erfindung sind kombiniert werden können.

[0022] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch -Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Pantotheninsäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0023] Das zu verwendende Kulturmödium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmödien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren

wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies zur zusätzlichen Steigerung der Pantothenäure-Produktion Vorstufen der Pantothenäure wie Aspartat, β -Alanin, Ketoisovalerat, Ketopantoinsäure oder Pantoinsäure und gegebenenfalls deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefügt werden.

[0024] Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischäummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 50°C und vorzugsweise bei 25°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Pantothenäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0025] Stämme, die eine hohe Aktivität des Enzyms L-Aspartat 1-Decarboxylase besitzen, können auch für die Herstellung von β -Alanin aus L-Aspartat eingesetzt werden: Hierzu können fermentative Verfahren, enzymatische Umwandlungsreaktionen oder Kombinationen beider eingesetzt werden.

[0026] Die Konzentration an gebildeter Pantothenäure kann mit bekannten Verfahren (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)) bestimmt werden.

[0027] Folgende Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

- 30 Corynebacterium glutamicum ATCC13032/pND-D2 als DSM12438
 Corynebacterium glutamicum ATCC13032/pND-DBC2 als DSM12437

Beispiele

35 [0028] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

40 Klonierung und Sequenzierung des panD-Gens von C. glutamicum

1. Klonierung des panD-Gens

[0029] Chromosomal DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid, 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit der Restriktionsenzym Sau3A (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Sau3A, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 7-9 kb wurden mit Hilfe des "Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids" (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland; Cat. No. 740584) isoliert und in die dephosphorylierte BamHI-Schnittstelle des Vektors pUC19 (Norrrander et al., 1982, Gene, 26:101-106), der von der Firma MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) bezogen wurde, ligiert. Die Ligation wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academies of Sciences USA, 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert. Nach Inkubation für 24 Stunden bei 37°C konnte die C. glutamicum Genbank durch Reisolierung der Plasmid-DNA nach der "Alkalischen-Lyse-Methode" von Birnboim und Doly (Nucleic Acids Research, 7: 1513-1523, 1997) aus den Transformanten gewonnen werden. Mit dieser Genbank wurden kompetente Zellen des E. coli Stamms DV9 (Vallari und Rock, 1985, Journal of Bacteriology, 164:136-142), welcher eine Mutation im panD-Gen trägt, elektroporiert. Der Elektroporationsansatz wurde im Anschluß

EP 1 006 192 A2

an die Regenerationsphase (Tauch et.al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) zweimal mit Medium E (Vogel and Bonner, 1956, Journal of Biological Chemistry, 218:97-106) gewaschen. Die Zusammensetzung des Mediums E ist in Tabelle 1 dargestellt. Mit diesen Zellen wurden 50 ml Medium E + 100 µg/ml Ampicillin, die in einem 250 ml Erlenmeyerkolben vorlagen, inoculiert und in einem Luftschüttler bei 250 U/min und 39°C inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation wurde die Bakteriensuspension verdünnt und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) ausgestrichen, der mit 100 µg/ml Ampicillin supplementiert worden war.

Tabelle 1

	Substanz	Menge pro Liter	Bemerkung
10	K ₂ HPO ₄	10 g	
15	NaNH ₄ HPO ₄ * 4 H ₂ O	3,5 g	
	Zitronensäure	2 g	
20	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,2 g	
	Glukose	4 g	separat sterilisieren
	Thiamin	0,2 µg	sterifiltrieren

[0030] Die Plasmid-DNA einer DV9-Transformante wurde isoliert, als pNIC-1.3 bezeichnet und mittels Agarosegel-elektrophorese (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour-Laboratory Press) und Vergleich mit Standard-DNA-Fragmenten bekannter Länge charakterisiert. Plasmid pNIC-1.3 enthält eine

25 Insertion von 7 kbp Länge. Die Komplementationsfähigkeit von pNIC-1.3 wurde durch erneute Transformation der panD Mutante DV9 überprüft. Die erhaltenen Transtormanten waren wiederum fähig, in β-Alanin-freiem Medium E unter den oben angegebenen Bedingungen zu wachsen.

[0031] Die Subklonierung des 7 kb Inserts erfolgte durch Spaltung des Plasmids pNIC-1.3 mit den Restriktionszymen BamHI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-03), EcoRI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung EcoRI, Code no. 27-0884-03) und BglII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung BglII, Code no. 27-0946-02) und anschließender Ligation in den entsprechend restriktionsverdauten Vektor pK18mob (Schäfer, 1994, Gene, 145:69-73). Der erhaltene Ligationsansatz wurde in die E. coli panD Mutante DV9 elektroporiert; die Selektion auf komplementierte Transformanten erfolgte wie oben beschrieben wobei die Agarplatten in diesem Fall 50 µg/ml Kanamycin enthielten. Die Plasmide 35 von komplementierten Einzelklonen wurden isoliert und mittels Restriktionsanalysen charakterisiert. Ein EcoRI-Subklon, im Folgenden pNIC-10 genannt, mit einem ungefähr 3 kb großen DNA-Insert wurde für die folgende Sequenzanalyse ausgewählt.

2. Sequenzierung des panD-Gens

[0032] Für die doppelsträngige Sequenzierung des 3 kb Fragments von pNIC-10 wurde dieses mit verschiedenen Restriktionszymen gespalten und die Fragmente in die Plasmide pUC19 oder pK18mob subkloniert. Die zum Sequenzieren eingesetzte Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben mit dem "QIAGEN Plasmid Mini kit" (Qiagen, Inc., Chatsworth, Ca., USA) isoliert und die Bestimmung der Plasmidgrößen mittels Agarosegelektrophorese durchgeführt.

[0033] Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (Proceedings of the National Academies of Sciences USA, 74:5453-5467, 1977) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (Nucleic Acids Research, 18:1067, 1990). Es wurde der "Cy5-AutoRead Sequencing kit" von Pharmacia (Product No. 27-2690-02, Freiburg, Germany) angewandt. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion 50 erfolgte in einem "Long Ranger Gel Solution"-Polyacrylamidgel (FMC BioProducts, Rockland, Me., USA) mit dem "automatischen Laser-Fluoreszenz (A.L.F.) Express DNA Sequenzergerät" von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (Nucleic Acids Research, 14:217-231, 1986) Version 97-0 prozessiert. Sämtliche Einzelsequenzen der pNIC-10 Subklone wurden zu einem zusammenhängenden 3060 bp langen Contig assembliert, der als Contig13 bezeichnet wurde. 55 Die computergestützte Kodierbereichsanalyse mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) des gesamten DNA-Fragments ergab die Identifizierung von fünf offenen Leseraster (ORFs). In Abbildung 1 ist eine Restriktionskarte von Contig13 sowie die Lage der als orf- bis orf-5 bezeichneten ORFs dargestellt. Homologieanalysen wurden mit den "BLAST search programs" (Gish and States, 1993, Nature of Genetics,

EP 1 006 192 A2

3:266-272; Altschul et al., 1990, Journal of Molecular Biology, 215:403-410), welche über den Online-Service des NCBI-Servers der "National Library of Medicine" (Bethesda, MD, USA) zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt. Die Analyse von Contig13 ergab, daß orf-3 das panD-Gen ist. Im Folgenden wird orf-3 als panD bezeichnet. Die Nukleotidsequenz des das panD-Gen tragenden DNA-Fragmentes ist als SEQ ID NO 1 wiedergegeben. Die Aminosäuresequenz des sich mit obigen Methoden ergebenden panD-Genproduktes nämlich der L-Aspartat 1-Decarboxylase ist als SEQ ID NO 2 wiedergegeben.

Beispiel 2

10 Klonierung und Sequenzierung der Gene panB und panC aus C. glutamicum

1. Klonierung der Gene panB und panC

[0034] Chromosomal DNA von C. glutamicum ATCC13032 wurde wie bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) beschrieben isoliert und mit der Restriktionsendonuklease Sau3A geschnitten. Nach gelektrophoretischer Auftrennung wurden DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 3 bis 7 kb bzw. von 9 bis 20 kb extrahiert und nachfolgend in die singuläre BamHI Schnittstelle des Vektors pBR322 ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurde der E. coli Stamm DH5 α mcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 87 (1990) 4645-4649) transformiert (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166 (1983) 557-580). Inserttragende 20 Kolonien wurden anhand ihrer Tetracyclinsensitivität nach Überimpfen auf 10 µg/ml Tetracyclin enthaltende LB-Agarplatten identifiziert. Durch Plasmidpräparationen (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) von vereinigten Klonen wurden 8 Gruppen, welche je 400 Plasmide mit einer Insertgröße von 9 bis 20 kb und 9 Gruppen, welche je 500 Plasmide mit einer Insertgröße von 3 bis 7 kb, enthielten isoliert. Die E. coli panB Mutante SJ2 (Cronan et al. 1982, Journal of Bacteriology 149: 916-922) wurde mit dieser Genbank 25 mittels Elektroporation (Wehrmann et al. 1994, Microbiology 140: 3349-3356) transformiert. Die Transformationsansätze wurden direkt auf CGXII-Medium mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) ausplattiert. Von Klonen, welche in der Lage waren ohne Pantothenatsupplementation zu wachsen, wurde Plasmid-DNA isoliert (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Bei 8 Plasmiden konnte durch Retransformation die Fähigkeit, den panB-Defekt der E. coli Mutante SJ2 heterolog zu komplementieren, bestätigt werden.
30 [0035] Mit diesen 8 Plasmiden wurde eine Restriktionskartierung durchgeführt. Einer der untersuchten Plasmidvektoren, im Folgendem pUR1 genannt enthielt ein Insert von 9,3 kb (Abbildung 2). Die Transformation der E. coli panC Mutante DV39 (Vallari und Rock 1985, Journal of Bacteriology 164: 136-142) ergab, daß der Vektor pUR1 ebenfalls in der Lage war den panC Defekt dieser Mutante zu komplementieren.

35 2. Sequenzierung des panB- und des panC-Gens

[0036] Ein 2,2 kb großes Fragment des Inserts (Abbildung 2) von pUR1 wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. sequenziert (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurden zunächst mittels Exonuklease III Subklone erzeugt, die mit Hilfe von Standard Primern (Universal und reverse primer der Firma Boehringer Mannheim, Deutschland) sequenziert wurden. Die gelektrophoretische Analyse der Sequenzieransätze erfolgte mit dem automatischen Laser-Fluoreszenz-Sequenzergerät (A.L.F.) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programm Paket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO 3 wiedergegeben. Die Analyse ergab die Identifizierung von zwei offenen Leserastern. Ein offenes Leseraster von 813 bp Länge, das als panB-Gen identifiziert wurde, kodiert für ein Polypeptid von 271 Aminosäuren und ist als SEQ ID NO 4 wiedergegeben. Das zweite offene Leseraster, das als panC-Gen identifiziert wurde, umfaßt 837 Basenpaare. Es kodiert für ein Polypeptid von 279 Aminosäuren, das als SEQ ID NO 5 wiedergegeben ist.

50 Beispiel 3

Konstruktion von Vektoren zur Expression von panD, panBC und panDBC

[0037] Die Pantothenatbiosynthese-Gene aus C. glutamicum und E. coli wurden unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonucleotiden amplifiziert. Die PCR-Experimente wurden mit der Tag DNA polymerase der Firma Gibco-BRL (Eggstein, Deutschland) in einem "PCT-100 Thermocycler" (MJ Research Inc., Watertown, Mass., USA) durchgeführt. Auf einen einmaligen Denaturierungsschritt von 2 Minuten bei 94°C folgte ein Denaturierungsschritt von 90 Sekunden bei 94°C, ein Annealingschritt für 90 Sekunden bei einer Primerabhängigkeit

EP 1 006 192 A2

- gen Temperatur von T=(2AT+4GC) -5 °C (Suggs, et al., 1981, S. 683-693, In: D. D. Brown, and C. F. Fox (Eds.), Developmental biology using purified genes. Academic Press, New York, USA) sowie ein 90 Sekunden dauernder Extensionsschritt bei 72°C. Die letzten drei Schritte wurden 35 mal zyklisch wiederholt und die Reaktion wurde mit einem finalen Extensionsschritt von 10 Minuten bei 72°C beendet. Die so amplifizierten Produkte wurden, nachdem sie im Agarosegel elektrophoretisch geprüft worden sind, den Herstellerangaben zufolge in den Vektor pCR®2.1 (Original TA Cloning Kit, Invitrogen (Leek, Niederlande), Produktbeschreibung Original TA Cloning® Kit, Cat. no. KNM2030-01.) ligiert und anschließend in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert. Die Selektion auf Transformanten erfolgte durch Inkubation bei 37°C für 24 Stunden auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktosid).
- [0038] Ausgehend von den Nucleotidsequenzen der Pantothenatbiosynthese-Gene panD (SEQ ID NO 1) und panBC (SEQ ID NO 3) von C. glutamicum ATCC 13032 und von E. coli K12 (W.K. Merkel and B.P. Nichols, 1993, Gen-Bank: L17086) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland). Diese Primer wurden so ausgewählt, daß die amplifizierten Fragmente die Gene sowie deren native Ribosomen-Bindestellen, nicht aber mögliche Promotor-Regionen enthalten. Zusätzlich wurden geeignete Restriktionsschnittstellen eingefügt, die das Klonieren in den Zielvektor ermöglichen. Die Sequenzen der PCR-Primer, die eingefügten Schnittstellen (Sequenz unterstrichen) sowie das amplifizierte Gen (Fragmentgröße in bp ist in Klammern angegeben) sind in der folgenden Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2

	Primer	Sequenz mit Restriktionsschnittstelle	Produkt	Plasmid
25	panD-Ec1	5'- <u>GAATTCTGACAGGGTAGAAAGGTAGA</u> -3' EcoRI	panD _{E.c.} (462 bp)	pND-D1
30	panD-Ec2	5'- <u>AGATCTGGATAACAATCAAGCAACC</u> -3' BglII		
35	panD-Cg1	5'-CATCTCACGCTAT <u>GAATTCT</u> -3' EcoRI	panD _{C.g.} (405 bp)	pND-D2
40	panD-Cg2	5'-ACGAGGC <u>CTGCAGCAATA</u> -3' PstI		
45	panBC-E1	5'- <u>GGATCCCACAAACATCAATTATCAGG</u> -3' BamHI	panBC _{E.c.} (1700 bp)	pND-BC1
50	panBC-E2	5'- <u>GGATCCTTAAGTATTACGCCAGCTC</u> -3' BamHI		
55	panBC-C1	5'- <u>GTCGACTCTGAGCTGGTCATCACATC</u> -3' SalI	panBC _{C.g.} (1700 bp)	pND-BC2
	panBC-C2	5'- <u>GTCGACACGCAGGGTTGGTACTAGAG</u> -3' SalI		

[0039] Als Basisvektor zur Expression sowohl in *C. glutamicum* als auch in *E. coli* wurde der in Abbildung 3 dargestellte *E. coli*-*C. glutamicum*-Shuttle-Expressionsvektor pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) eingesetzt. Die zuvor in den Vektor pCR®2.1 klonierten Amplifikate wurden mittels der Primer-inserierten Restriktionsschnittstellen in den ebenso behandelten Expressionsvektor pZ8-1 ligiert und somit unter die Kontrolle des auf diesem Plasmid enthaltenen tac-Promotors gebracht. Einzige Ausnahme stellt das Amplifikat panD_{E.c.} dar, hier wurde das EcoRI-BgIII-Fragment in die kompatiblen EcoRI-BamHI-Restriktionsenden des Vektors pZ8-1 kloniert. Die jeweiligen Plasmidbezeichnungen für die so konstruierten Expressionsplasmide sind in der Tabelle 2 angegeben. Der Expressionsvektor pZ8-1 mit dem Gen panD_{E.c.} von *E. coli* wird pND-D1 und pZ8-1 mit dem Gen panD_{C.g.} von *C. glutamicum* wird pND-D2 genannt. Entsprechend werden die Expressionsplasmide, die PanBC_{E.c.} und panBC_{C.g.} enthalten als pHD-BC1 bzw. pND-BC2 bezeichnet. Beispielhaft ist in der Abbildung 3 die Klonierungsstrategie für die Gene panD_{E.c.} und panD_{C.g.} in den Vektor pZ8-1 dargestellt. Die korrekte Klonierung aller Expressionsplasmide wurde durch Sequenzierung der jeweiligen Inserts überprüft.

[0040] Weiterhin wurden sowohl mit den *E. coli* als auch mit den *C. glutamicum* panD-Genen ein künstliches panDBC-Operon konstruiert. Für das *E. coli* Operon wurde der panD_{E.c.} enthaltende Vektor pCR2.1 mit EcoRI gespalten, die DNA im Agarosegel aufgetrennt und das panD-Fragment wurde, wie schon in Beispiel 1.1 beschrieben, mittels "Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids" (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) aus dem Gel aufgereinigt. Anschließend wurde das Fragment in das EcoRI gespaltene Plasmid pHD-BC1 ligiert. Plasmide mit einer korrekten Orientierung des panD-Gens wurden dadurch erhalten, daß das Ligationsgemisch in den panD auxotrophen *E. coli* Stamm DV9 transformiert und dieser wie in Beispiel 1 beschrieben auf Komplementation der Auxotrophie hin selektioniert wurde. Plasmid-DNA der komplementierten Mutanten wurde isoliert und die korrekte Genanordnung wurde durch Ansequenzierung des Inserts des pND-DBC1 genannten Plasmids bestätigt (Abbildung 4).

[0041] Für die Konstruktion des *C. glutamicum* panDBC-Operons wurde ähnlich verfahren. Der panD_{C.g.} enthaltene Vektor pCR2.1 wurde EcoRI gespalten, wodurch das panD_{C.g.}-Gen zum einen über die Primer-interne und zum anderen über eine EcoRISchnittstelle des Vektors aus diesem herausgespalten wurde. Dieses Gen-Fragment wurde nach Aufreinigung in den EcoRIGespaltenen Vektor pZ8-1 kloniert und Plasmide mit der korrekten panD-Orientierung, pND-D4 genannt, wurden wie oben beschrieben erhalten und überprüft. Anschließend wurde das Plasmid pND-D4 mit dem Restriktionsenzym Sall gespalten und mit dem aufgereinigten panBC-Fragment, welches durch Sall-Verdau (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Sall Code no. 27-0882-01) des Plasmids pND-BC2 erhalten wurde, ligiert. Das Elektroporationsgemisch wurde in den *E. coli* Stamm DH5αMCR elektroporiert und die Plasmide mit der Genanordnung panDBC wurden durch Restriktionsanalysen ermittelt. Die korrekte Genanordnung eines dieser Plasmide, das als pND-DBC2 (Abbildung 4) bezeichnet wurde, wurde durch Sequenzanalyse verifiziert.

[0042] Der Expressionsvektor pZ8-1 sowie die auf diesem Plasmid beruhenden Konstrukte pND-D1, pND-D2 und pND-DBC1 wurden in den *E. coli* Stamm MG1655 transformiert und Transformanten auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 50 µg/ml Kanamycin selektioniert. Die erhaltenen Stämme wurden MG1655/pZ8-1, MG1655/pND-D1, MG1655/pND-D2 und MG1655/pND-DBC1 genannt.

[0043] Durch Elektroporation der Plasmide pZ8-1, pND-D1, pND-D2 und pND-DBC2 in den *C. glutamicum* Stamm ATCC13032 und anschließender Selektion auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 25 µg/ml Kanamycin wurden die Stämme ATCC13032/pZ8-1, ATCC13032/pND-D1, ATCC13032/pND-D2 und ATCC13032/pND-DBC2 erhalten.

40

Beispiel 4

Bildung von Pantothenat durch verschiedene *E. coli* K12 Stämme

[0044] Die quantitative Bestimmung von D-Pantothenat erfolgte mittels des *Lactobacillus plantarum* Pantothenat-Assays (Teststamm: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, Cat. No.3211-30-3; Kulturmedium: Bacto Pantothenate Assay Medium (DIFCO Laboratories, Michigan, USA), Cat. No. 0604-15-3) Dieser Indikatorstamm kann nur bei Anwesenheit von Pantothenat im angegebenen Kulturmedium wachsen und zeigt eine photometrisch meßbare, lineare Abhängigkeit des Wachstums von der Pantothenat-Konzentration des Mediums. Für die Kalibrierung wurde das Hemicalciumsalz von Pantothenat eingesetzt (Sigma, Produktbezeichnung P 2250). Die optische Dichte wurde an einem LKB Biochrom Photometer der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 580 nm (o.D.₅₈₀)bestimmt.

[0045] Für die Pantothenat-Produktion der *E. coli* Stämme MG1655/pZ8-1, MG1655/pND-D1, MG1655/pND-D2 und MG1655/pND-DBC1 wurden 50 ml Testmedium (Medium E mit 50 µg/ml Kanamycin) aus einer 16 Stunden alten Kultur des gleichen Mediums mit einer o.D.₅₈₀ von 0,1 angeimpft. Nach 5 und 72stündiger Inkubation dieser Kulturen bei 37°C und 250 (U/min wurden die Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 5000 x g pelletiert. Der erhaltene zellfreie Überstand wurde sterilfiltriert und bis zur Pantothenat-Quantifizierung bei 4°C gelagert.

[0046] Die Quantifizierung des D-Pantothenats im Kulturüberstand erfolgte mittels *L. plantarum* ATCC 8014 nach

EP 1 006 192 A2

Angaben des Handbuchs der Firma DIFCO (DIFCO MANUAL, 10th Edition, S. 1100-1102; Michigan, USA). Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

Stamm	Gen	oD ₅₈₀ und Pantothenat-Akkumulation (µg/ml)			
		5 Std.		72 Std.	
		oD ₅₈₀	Pan.	oD ₅₈₀	Pan.
MG1655/pZ8-1	-	2,0	0,30	2,3	1,47
MG1655/pND-D1	panD _{E.c.}	2,3	0,90	2,5	6,95
MG1655/pND-DBC1	PanDBC _{E.c.}	2,0	0,96	2,0	6,96
MG1655/pND-D2	panD _{C.g.}	2,2	4,07	2,3	9,66

Beispiel 5

Bildung von Pantothenat durch verschiedene Stämme von C. glutamicum

[0047] Die Bildung von Pantothenat durch die C. glutamicum Stämme ATCC13032/pZ8-1, ATCC13032/pND-D1, ATCC13032/pND-D2 und C. glutamicum ATCC13032/pND-DBC2 wurden in Medium CGXII (Keilhauer et al., 1993, Journal of Bacteriology, 175:5595-5603; Tabelle 4), das mit 25 µg/ml Kanamycin supplementiert wurde, geprüft. Dieses Medium wird im Folgenden als C. glutamicum-Testmedium bezeichnet. Je 50 ml C. glutamicum-Testmedium wurden aus einer 16 Stunden alten Kultur des gleichen Mediums mit einer o.D.₅₈₀ von 0,1 angeimpft. Nach 48stündiger Inkubation bei 30°C und 150 U/min wurden die Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 5000 x g entfernt, der Überstand sterilfiltriert und die Pantothenat-Konzentration wie in Beispiel 4 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse der Pantothenat-Produktion durch die verschiedenen Stämme von C. glutamicum sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 4

Substanz	Menge pro Liter	Bemerkung
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g	
Harnstoff	5 g	
KH ₂ PO ₄	1 g	
K ₂ HPO ₄ 1 g		
MgSO ₄ * 7 H ₂ O 0.25 g		
MOPS	42 g	
CaCl ₂	10 mg	
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg	
MnSO ₄ * H ₂ O	10 mg	
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	1 mg	
CuSO ₄	0.2 mg	
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	0.02 mg	
Biotin	0.5 mg	
Glukose	40 g	separat autoklavieren
Protocatechusäure	0.03 mg	sterilfiltrieren

Tabelle 5

Stamm	Gen	Pantothenat ($\mu\text{g/ml}$)	
		oD_{580}	Pan.
ATCC13032/pZ8-1	-	21	0,19
ATCC13032/pND-D1	PanDE.c.	20	0,32
ATCC13032/pND-D2	panDC.g.	19	1,78
ATCC13032/pND-DBC2	panDBC _{C,g.}	20	2,60

15 Abbildungen

[0048] Folgende Abbildungen sind beigelegt:

- Abbildung 1: Karte des Contig13 mit orf-1-orf-5
- Abbildung 2: Karte des in pUR1 enthaltenen, klonierten DNA-Fragmentes und Lageangabe des sequenzierten DNA-Abschnittes
- Abbildung 3: Karte der Plasmide pZ8-1, pND-D1 und pND-D2
- Abbildung 4: Karte der Plasmide pND-DBC1 und pND-DBC2

25 [0049] Die in den Abbildungen verwendeten Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

rrnBT1T2: Transkriptions-Terminator des rrnB-Gens

Ptac: tac Promotor

30 panB: Kodierbereich des panB Gens

panC: Kodierbereich des panC Gens

35 panD: Kodierbereich des panD Gens

rep-C.g.: DNA-Region für Replikation in C. glutamicum

oriV-E.c.: Ursprung für vegetativen Transfer in E. coli

40 kan: Resistenzgen für Kanamycin

EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzymes EcoRI

45 E: Schnittstelle des Restriktionsenzymes EcoRI

BamHI: Schnittstelle des Restriktionsenzymes BamHI

50 B: Schnittstelle des Restriktionsenzymes BamHI

BglII: Schnittstelle des Restriktionsenzymes BglII

Clal: Schnittstelle des Restriktionsenzymes Clal

55 H: Schnittstelle des Restriktionsenzymes HindIII

Ncol: Schnittstelle des Restriktionsenzymes Ncol

EP 1 006 192 A2

Nrul: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Nrul

Nsil: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Nsil

5 P: Schnittstelle des Restriktionsenzyms PstI

PstI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms PstI

10 Pvul: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Pvul

Sacl: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Sacl

Sall: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Sall

15 Scal: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Scal

SphI: Schnittstelle des Restriktionsenzyms SphI

20 X: Schnittstelle des Restriktionsenzyms XbaI

Xhol: Schnittstelle des Restriktionsenzyms Xhol

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

5

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Degussa Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Weissfrauenstr. 9
- (C) ORT: Frankfurt am Main
- (D) BUNDESLAND: Hessen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-60311

15

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur
fermentativen Herstellung von D-Pantothensaure
durch Verstaerzung des panD-Gens in
Mikroorganismen

20

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRAEGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version
#1.30 (EPA)

25 /

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 540 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGEFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

40

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum
- (B) STAMM: ATCC13032

45

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
- (B) LAGE: 77..484
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 77

50

EP 1 006 192 A2

/EC_number= 4.1.1.11
 /product= "L-Aspartat-1-decarboxylase"
 /gene= "panD"

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

10	ATATTCCTT TCCTTGTCA CTCACGCTAT GATTCTAAA ACTTGCAGGA CAACCCCAT	60
	AAGGACACCA CAGGAC ATG CTG CGC ACC ATC CTC GGA AGT AAG ATT CAC Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His	109
	1 5 10	
15	CGA GCC ACT GTC ACT CAA GCT GAT CTA GAT TAT GTT GGC TCT GTA ACC Arg Ala Thr Val Thr Gln Ala Asp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr	157
	15 20 25	
20	ATC GAC GCC GAC CTG GTT CAC GCC GGC GGA TTG ATC GAA GGC GAA AAA Ile Asp Ala Asp Leu Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys	205
	30 35 40	
25	GTT GCC ATC GTA GAC ATC ACC AAC GGC GCT CGT CTG GAA ACT TAT GTC Val Ala Ile Val Asp Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val	253
	45 50 55	
30	ATT GTG GCC GAC GCC GGA ACG GGC AAT ATT TGC ATC AAT GGT GCC GCT Ile Val Gly Asp Ala Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala	301
	60 65 70 75	
35	GCA CAC CTT ATT AAT CCT GGC GAT CTT GTG ATC ATC ATG AGC TAC CTT Ala His Leu Ile Asn Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu	349
	80 85 90	
40	CAG GCA ACT GAT GCG GAA GCC AAG GCG TAT GAG CCA AAG ATT GTG CAC Gln Ala Thr Asp Ala Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His	397
	95 100 105	
45	GTG GAC GCC GAC AAC CGC ATC GTT GCG CTC GGC AAC GAT CTT GCG GAA Val Asp Ala Asp Asn Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu	445
	110 115 120	
50	GCA CTA CCT GGA TCC GGG CTT TTG ACG TCG AGA AGC ATT TAGCGTTTA Ala Leu Pro Gly Ser Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile	494
	125 130 135	
	GCTGCCAAT ATTGCTGCCG GCCTCGTTGA AAATGGTCAT GGTGGC	540

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

40

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LAENGE: 136 Aminosaeuren
 - (B) ART: Aminosaeure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

45

- (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

50

Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His Arg Ala Thr Val Thr	
1 5 10 15	
Gln Ala Asp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr Ile Asp Ala Asp Leu	
20 25 30	
Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys Val Ala Ile Val Asp	
35 40 45	

55

EP 1 006 192 A2

	Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val Ile Val Gly Asp Ala			
	50	55	60	
5	Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala Ala His Leu Ile Asn			
	65	70	75	80
	Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu Gln Ala Thr Asp Ala			
	85	90	95	
10	Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His Val Asp Ala Asp Asn			
	100	105	110	
	Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu Ala Leu Pro Gly Ser			
	115	120	125	
15	Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile			
	130	135		
	(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:			
	(i) SEQUENZKENNZEICHEN:			
	(A) LAENGE: 2164 Basenpaare			
	(B) ART: Nucleotid			
20	(C) STRANGFORM: Doppelstrang			
	(D) TOPOLOGIE: linear			
	(ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA			
	(iii) HYPOTHETISCH: NEIN			
25	(iv) ANTISENSE: NEIN			
	(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:			
	(A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum			
	(B) STAMM: ATCC13032			
30	(ix) MERKMALE:			
	(A) NAME/SCHLUESSEL: CDS			
	(B) LAGE: 351..1163			
	(D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 351			
	/EC_number= 4.1.2.12			
	/product= "Ketopantoathydroxymethyltransferase"			
	/gene= "panB"			
35	(ix) MERKMALE:			
	(A) NAME/SCHLUESSEL: CDS			
	(B) LAGE: 1166..2002			
	(D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 1166			
	/EC_number= 6.3.2.1			
	/product= "Pantothenatsynthetase"			
40	/gene= "panC"			
	(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:			
	GCTTCGGGGT ACCAATTCT TTAAGAACCA TCAGATCAAT CTGTTGTACA TTCTCGGCCA		60	
45	GATTCAGCTT TTCGGTAAGG ACGAAACACT TTCACTTGAA TCGGCAGCAA AGTTTCTTAA		120	
	AGTTTCTAAG GCAACTGCAA CGAGGTATTT TAGAACTCTC CGAGAAATGG ATTAGTTCA		180	
	CGAGGTCAGC AAACGCCCTT TGCGGTTGTC GCTCACGGAT AAAGGTCGTG AGATAGTAGG		240	
50	TCTTGAGGTA AAAATTGAC TCCATAACGA GAACTTAATC GAGAACACCC CCTGAACAGT		300	
	GAATCAAATC GGAATTATT TATTCTGAGC TGGTCATCAC ATCTATACTC ATG CCC		356	
	Met Pro			

EP 1 006 192 A2

	ATG TCA GGC ATT GAT GCA AAG AAA ATC CGC ACC CGT CAT TTC CGC GAA Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe Arg Glu 140 145 150	404
5	GCT AAA GTA AAC GGC CAG AAA GTT TCG GTT CTC ACC AGC TAT GAT GCG Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr Asp Ala 155 160 165 170	452
10	CTT TCG GCG CGC ATT TTT GAT GAG GCT GGC GTC GAT ATG CTC CTT GTT Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu Leu Val 175 180 185	500
15	GGT GAT TCC GCT GCC AAC GTT GTG CTG GGT CGC GAT ACC ACC TTG TCG Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr Leu Ser 190 195 200	548
20	ATC ACC TTG GAT GAG ATG ATT GTG CTG GCC AAG GCG GTG ACG ATC GCT Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr Ile Ala 205 210 215	596
25	ACG AAG CGT GCG CTT GTG GTG GTT GAT CTG CCG TTT GGT ACC TAT GAG Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr Tyr Glu 220 225 230	644
30	GTG AGC CCA AAT CAG GCG GTG GAG TCC GCG ATC CGG GTC ATG CGT GAA Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met Arg Glu 235 240 245 250	692
35	ACG GGT GCG GCT GCG GTG AAG ATC GAG GGT GGC GTG GAG ATC GCG CAG Thr Gly Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile Ala Gln 255 260 265	740
40	ACG ATT CGA CGC ATT GTT GAT GCT GGA ATT CCG GTT GTC GGC CAC ATC Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly His Ile 270 275 280	788
45	GGG TAC ACC CCG CAG TCC GAG CAT TCC TTG GGC GGC CAC GTG GTT CAG Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val Val Gln 285 290 295	836
50	GGT CGT GGC GCG AGT TCT GGA AAG CTC ATC GCC GAT GCC CGC GCG TTG Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg Ala Leu 300 305 310	884
	GAG CAG GCG GGT GCG TTT GCG GTT GTG TTG GAG ATG GTT CCA GCA GAG Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro Ala Glu 315 320 325 330	932
	GCA GCG CGC GAG GTT ACC GAG GAT CTT TCC ATC ACC ACT ATC GGA ATC Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile Gly Ile 335 340 345	980
	GGT GCC GGC AAT GGC ACA GAT GGG CAG GTT TTG GTG TGG CAG GAT GCC Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln Asp Ala 350 355 360	1028
	TTC GGC CTC AAC CGC GGC AAG AAG CCA CGC TTC GTC CGC GAG TAC GCC Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu Tyr Ala 365 370 375	1076
	ACC TTG GGC GAT TCC TTG CAC GAC GCC GCG CAG GCC TAC ATC GCC GAT Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile Ala Asp 380 385 390	1124

EP 1 006 192 A2

	ATC CAC GCG GGT ACC TTC CCA GGC GAA GCG GAG TCC TTT TA ATG CAG Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Ser Phe Met Gln 395 400 405 1	1171
5	GTA GCA ACC ACA AAG CAG GCG CTT ATC GAC GCC CTC CTC CAC CAC AAA Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His His Lys 5 10 15	1219
	TCC GTC GGG CTC GTC CCC ACC ATG GGT GCG CTA CAC AGC GGA CAC GCC Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly His Ala 10 20 25 30	1267
10	TCG TTG GTT AAA GCA GCA CGC GCT GAA AAC GAC ACT GTT GTA GCC AGT Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val Ala Ser 35 40 45 50	1315
15	ATT TTT GTC AAT CCC CTG CAG TTT GAA GCA CTC GGT GAT TGC GAT GAT Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys Asp Asp 55 60 65	1363
	TAC CGC AAC TAT CCC CGC CAA CTC GAC GCC GAT TTA GCA CTG CTT GAA Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu Leu Glu 70 75 80	1411
20	GAG GCA GGT GTG GAT ATT GTG TTC GCA CCC GAT GTG GAG GAA ATG TAC Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu Met Tyr 85 90 95	1459
25	CCC GGT GGC TTG CCA CTA GTG TGG GCG CGC ACC GGT TCC ATC GGA ACA Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile Gly Thr 100 105 110	1507
	AAA TTG GAG GGT GCC AGC AGG CCT GGC CAT TTC GAT GGT GTG GCT ACC Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val Ala Thr 115 120 125 130	1555
30	GTG GTG GCG AAG CTG TTC AAT TTG GTG CGC CCT GAT CGT GCA TAT TTT Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala Tyr Phe 135 140 145	1603
	GGA CAA AAA GAT GCT CAG CAG GTT GCG GTG ATT CGG CGA TTG GTT GCC Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu Val Ala 150 155 160	1651
35	GAT CTA GAC ATT CCC GTG GAG ATT CGT CCC GTT CCG ATT ATT CGT GGC Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile Arg Gly 165 170 175	1699
40	GCC GAT GGC TTA GCC GAA TCC AGC CGC AAT CAA CGT CTT TCT GCG GAT Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser Ala Asp 180 185 190	1747
	CAG CGA GCG CAA GCT CTG GTG CTG CCG CAG GTG TTG AGT GGG TTG CAG Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly Leu Gln 195 200 205 210	1795
45	CGT CGA AAA GCA GCT GGT GAA GCG CTA GAT ATC CAA GGT GCG CGC GAC Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala Arg Asp 215 220 225	1843
	ACC TTG GCC AGC GCC GAC GGC GTG CGC TTG GAT CAC CTG GAA ATT GTC Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu Ile Val 230 235 240	1891
50	GAT CCA GCC ACC CTC GAA CCA TTA GAA ATC GAC GGC CTG CTC ACC CAA Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu Thr Gln 245 250 255	1939

EP 1 006 192 A2

CCA GCG TTG GTG GTC GGC GCG ATT TTC GTG GGG CCG GTG CGG TTG ATC
 Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg Leu Ile
 260 265 270 1987

5 GAC AAT ATC GAG CTC TAGTACCAAC CCTGCGTTGC AGCACGCAGC TTTCGCATAAC 2042
 Asp Asn Ile Glu Leu 275

GCGTGCTCAG CTCAGTGTGTT TTAGGTGCCG GGTGCGGATC GGAACCGGGA GTTGGCCACT
 10 GCGGTGGCGT GGCGTCACCC GACAGCGCCC ATGCCGCCTG ACGAGCTGCA CCCAACGCCA 2162
 CA 2164

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LAENGE: 271 Aminosaeuren
 (B) ART: Aminosaeure
 (D) TOPOLOGIE: linear

20 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Pro Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe
 1 5 10 15

25 Arg Glu Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asp Ala Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu
 35 40 45

Leu Val Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr
 50 55 60

30 Leu Ser Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr
 65 70 75 80

Ile Ala Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr
 85 90 95

35 Tyr Glu Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met
 100 105 110

Arg Glu Thr Gly Ala Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile
 115 120 125

40 Ala Gln Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly
 130 135 140

His Ile Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val
 145 150 155 160

45 Val Gln Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg
 165 170 175

Ala Leu Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro
 180 185 190

50 Ala Glu Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile
 195 200 205

Gly Ile Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln
 210 215 220

EP 1 006 192 A2

Asp Ala Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu
225 230 235 240

5 Tyr Ala Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile
245 250 255

Ala Asp Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe
260 265 270

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 279 Aminosaeuren
- (B) ART: Aminosaeure
- (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Met Gln Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His
1 5 10 15

20 His Lys Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly
20 25 30

His Ala Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val
35 40 45

25 Ala Ser Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys
50 55 60

Asp Asp Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu
65 70 75 80

30 Leu Glu Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu
85 90 95

Met Tyr Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile
100 105 110

35 Gly Thr Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val
115 120 125

40 Ala Thr Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala
130 135 140

Tyr Phe Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu
145 150 155 160

45 Val Ala Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile
165 170 175

Arg Gly Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser
180 185 190

50 Ala Asp Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly
195 200 205

Leu Gln Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala
210 215 220

Arg Asp Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu
225 230 235 240

Ile Val Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu
245 250 255

5 Thr Gln Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg
260 265 270

Leu Ile Asp Asn Ile Glu Leu
275

10

Patentansprüche

- 15 1. In Mikroorganismen der Gattungen *Corynebacterium* und *Escherichia* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA, die eine für Aspartat-1-decarboxylase codierende Nucleotidsequenz enthält.
- 20 2. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 1, deren Nucleotidsequenz für panD mit der Herkunft aus einem *Corynebacterium* codiert, deren Lage in Abb. 1 wiedergegeben wird.
3. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, mit:
 - 25 (i) der Nucleotidsequenz, gezeigt in SEQ.-ID.-Nr. 1, die für panD codiert, oder
 - (ii) einer Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht; oder
 - 30 (iii) einer Sequenz, die mit einer zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).
- 35 4. Mikroorganismen, insbesondere der Gattungen *Corynebacterium* oder *Escherichia*, transformiert durch die Einführung der replizierbaren DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3.
- 40 5. Plasmidvektor pND-D2, gekennzeichnet durch die in der Abbildung 2 wiedergebene Restriktionskarte, hinterlegt als *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032/pND-D2 unter der Bezeichnung DSM 12438.
- 45 6. Plasmidvektor pND-DBC2, gekennzeichnet durch die in der Abbildung 4 wiedergebene Restriktionskarte hinterlegt als *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032/pND-DBC2 unter der Bezeichnung DSM12437.
7. Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure, indem man das panD-Gen und gegebenenfalls weitere für die Aspartat-1-decarboxylase codierende Nucleotidsequenzen in Mikroorganismen verstärkt (überexprimiert) und diese Mikroorganismen zur Fermentation einsetzt.
- 50 8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erzielung der Verstärkung die Kopienzahl der Gene bzw. Nucleotidsequenzen durch Transformation von Mikroorganismen mit diese Gene bzw. Nucleotidsequenzen tragenden Plasmidvektoren oder durch chromosomal Amplifikation erhöht.
- 55 9. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erzielung der Überexpression die sich stromaufwärts des Strukturgens befindende Promoter- und

Regulationsregion mutiert.

10. Verfahren gemäß Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Erzielung der Überexpression stromaufwärts des Strukturgens Expressionskassetten einbaut.
5
11. Verfahren gemäß Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Expression des panD-Gens in den Mikroorganismen durch Verlängerung der Lebensdauer der ent-
10 sprechenden m-RNA und/oder Verhinderung des Abbaus des zugehörigen Enzymproteins verbessert.
12. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das panD-Gen in Mikroorganismen überexprimiert, die weitere Metabolit- bzw. Antimetabolit-Resistenz-
15 mutationen aufweisen.
13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Mikroorganismen zu Erzielung der Überexpression in geänderten Kulturmedien fermentiert und/oder
20 die Fermentationsführung ändert.
14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die
25 die Pantothenat-(Pantothenensäure)-bildung verringern.
15. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich zum panD-Gen die übrigen Gene des Stoffwechsel-
30 weges der Pantothenensäurebildung, einzeln oder gemeinsam verstärkt (überexprimiert).
16. Verfahren gemäß Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man eines oder mehrere der Gene, die für die Enzyme Ketopantoat-
35 Hydroxymethyltransferase (EC 4.1.2.12), und Pantothenat-Synthetase (EC 6.3.2.1) kodieren, zusätzlich zum
panD-Gen, insbesondere mit der Herkunft Corynebacterium verstärkt (überexprimiert)
17. Verfahren gemäß den Ansprüchen 15 und 16,
dadurch gekennzeichnet,
40 daß man mit verschiedenen kompatiblen, die genannten Gene einzeln enthaltenden Plasmidvektoren transfor-
mierte Mikroorganismen einsetzt.
18. Verfahren gemäß den Ansprüchen 15 und 16,
dadurch gekennzeichnet,
45 daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt und der Plasmidvektor eines oder mehrere
der genannten Gene einschließlich des panD-Gens trägt, in dem die Gene nacheinander angeordnet und unter die
Kontrolle eines gemeinsamen Promoters oder getrennt voneinander angeordnet unter die Kontrolle verschiedener
Promotoren gestellt werden.
- 50 19. Verfahren gemäß Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß man mit dem Plasmidvektor pND-D2 transformierte Mikroorganismen einsetzt.
20. Verfahren gemäß Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
55 daß man mit dem Plasmidvektor pND-DBC2 transformierte Mikroorganismen einsetzt.
21. Verfahren zur Herstellung von Pantothenensäure,

EP 1 006 192 A2

dadurch gekennzeichnet,
daß man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation von Mikroorganismen gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
 in denen zumindest das panD-Gen verstärkt (überexprimiert) wird, gegebenenfalls in Kombination mit dem
 panB-und/oder panC-Gen,
 b) Anreicherung der Pantothenensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
 c) Isolieren der Pantothenensäure.
- 10 22. Verfahren gemäß Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß die überexprimierten Gene aus Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* stammen.
- 15 23. Verfahren gemäß den Ansprüchen 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß man in Stufe a) eine Vorstufe der Pantothenensäure zusetzt, ausgewählt aus der Gruppe Aspartat, β -Alanin,
Ketoisovalerat, Ketopantoat oder Pantoat.
- 20 24. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen der Gattungen *Escherichia* oder *Corynebacterium* einsetzt.

25

30

35

40

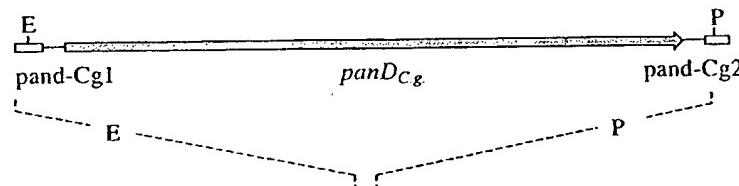
45

50

55

Abbildung 2

pND-D2



pND-D1

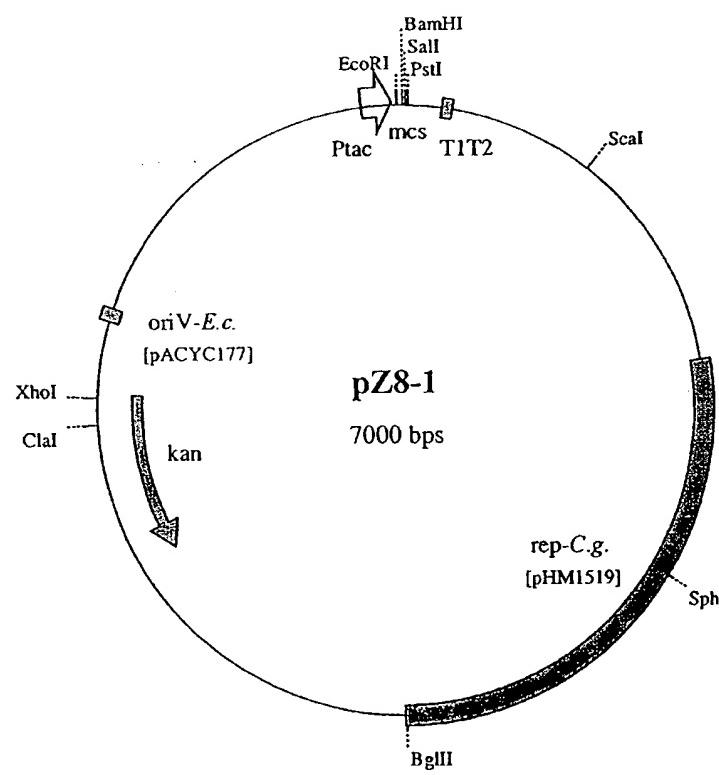
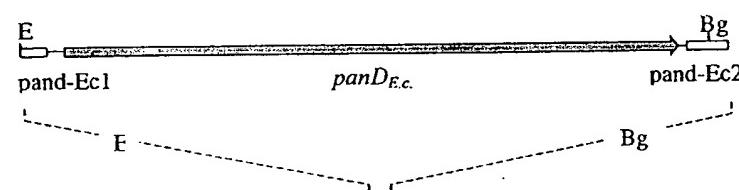
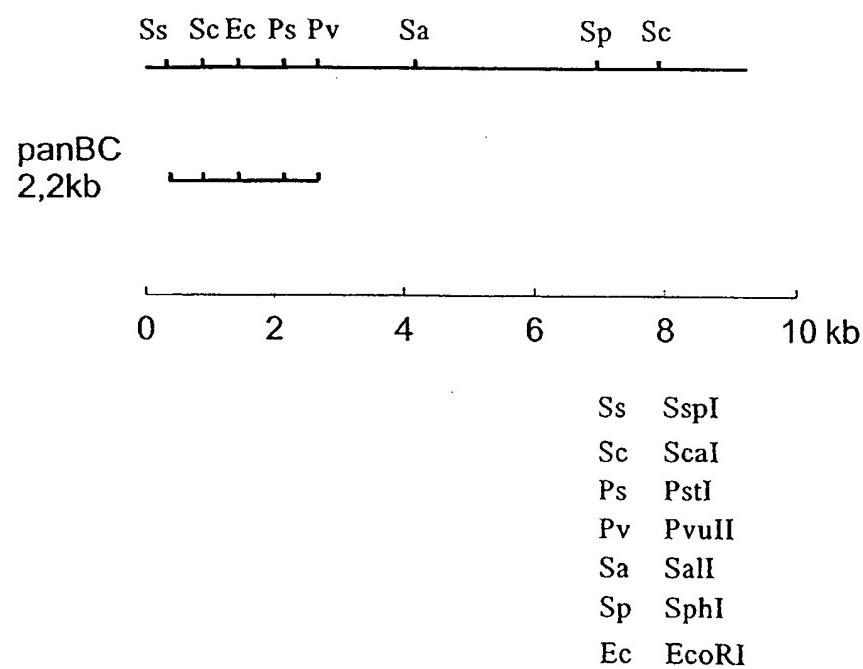
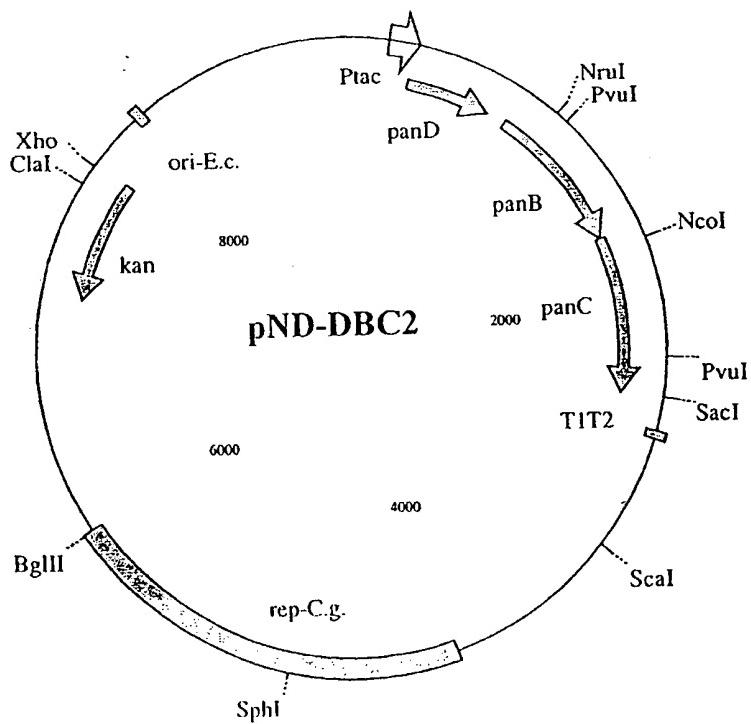
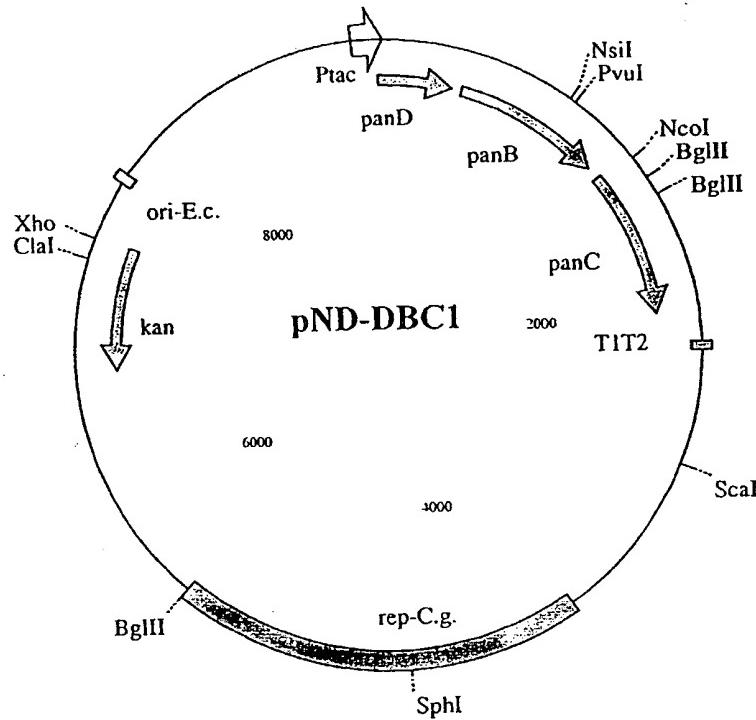


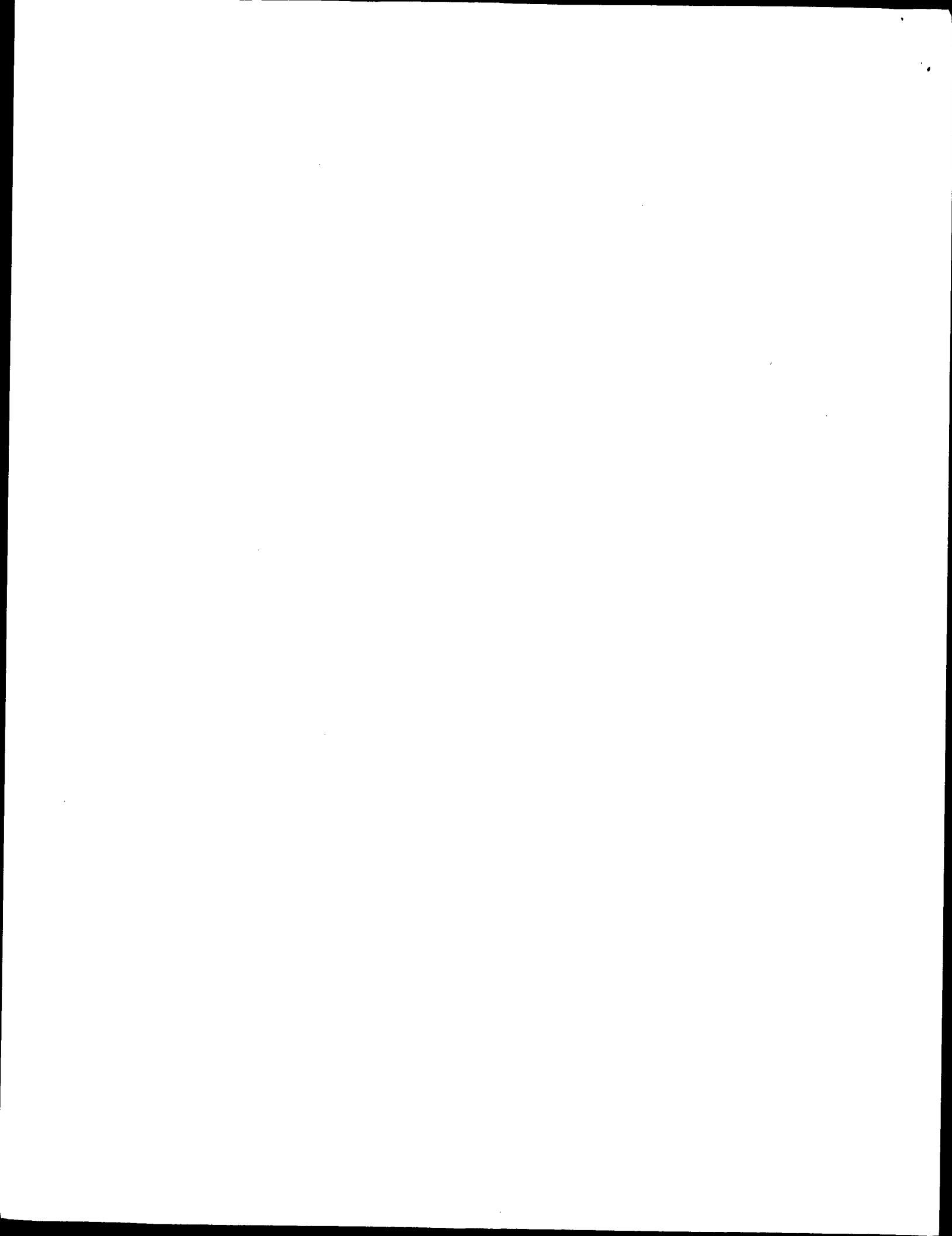
Abbildung 3



EP 1 006 192 A2

Abbildung 4:







(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11) EP 1 006 192 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
07.06.2000 Patentblatt 2000/23(51) Int. Cl.⁷: C12N 15/60, C12N 15/54,
C12N 15/77, C12P 13/02
// C12N1/21, (C12R1/15, 1:19)

(21) Anmeldenummer: 99122650.7

(22) Anmelddetag: 13.11.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SEBenannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 01.12.1998 DE 19855313

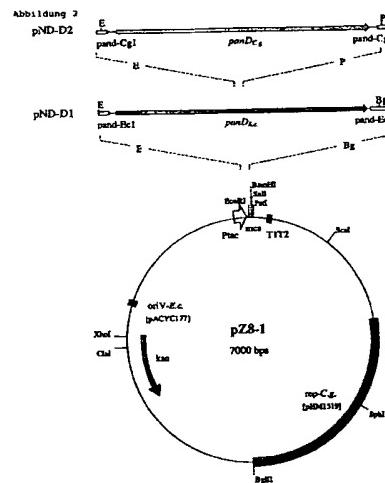
(71) Anmelder:
Degussa-Hüls Aktiengesellschaft
60287 Frankfurt am Main (DE)

(72) Erfinder:

- Dusch, Nicole, Dr.
33619 Bielefeld (DE)
- Kalinowski, Jörn, Dr.
33615 Bielefeld (DE)
- Pühler, Alfred, Prof. Dr.
33739 Bielefeld (DE)

(54) Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure durch Verstärkung des panD-Gens in Mikroorganismen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure durch Fermentation von Mikroorganismen, in denen zumindest das panD-Gen verstärkt (überexprimiert) wird, gegebenenfalls in Kombination mit dem panB- und/oder panC-Gen, und Anreicherung der Pantothensäure im Medium oder den Zellen der Mikroorganismen.



EP 1 006 192 A2

Process for the production of D-pantothenic acid by fermentation through amplification of the panD gene in microorganisms

The invention relates to a process for the production of D-pantothenic acid by fermentation of microorganisms in which at least the panD gene is amplified (overexpressed), where appropriate in combination with the panB and/or panC gene, and concentration of the pantothenic acid in the medium or the cells of the microorganisms.

Description

Prior art

Pantothenic acid is a commercially important vitamin which is used in cosmetics, medicine, human nutrition and livestock nutrition.

Pantothenic acid can be produced by chemical synthesis or biotechnologically by fermentation of suitable microorganisms in suitable nutrient solutions. An important intermediate in the chemical synthesis is DL-pantolactone. It is prepared in a multistage process from formaldehyde, isobutyraldehyde and cyanide. In further process steps, the racemic mixture of this fractionated and D-pantolactone is condensed with β -alanine to result in D-pantothenic acid.

The advantage of production by fermentation of microorganisms is that the required stereoisomeric D form is formed directly, free of L-pantothenic acid.

Various species of bacteria such as, for example, *Escherichia coli*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* and also yeasts such as, for example, *Debaromyces castellii* can, as shown in EP-A 0 493 060, produce D-pantothenic acid in a nutrient solution containing glucose, DL-pantoic acid and β -alanine. EP-A 0 493 060 further shows that the formation of D-pantothenic acid is improved in *Escherichia coli* through amplification of pantothenic acid biosynthesis genes from *E. coli*, which are present on the plasmids pFV3 and pFV5, in a nutrient solution containing glucose, DL-pantoic acid and β -alanine.

EP-A 0 590 857 and US Patent 5,518,906 describe mutants derived from the *Escherichia coli* strain IFO3547, such as FV5714, FV525, FV814, FV521, FV221, FV6051 and FV5069, which harbor resistances to various antimetabolites such as salicylic acid, α -ketobutyric acid, β -hydroxyaspartic acid, O-methylthreonine and α -ketoisovaleric acid and produce pantoic acid in a nutrient solution containing glucose and produce D-pantothenic acid in a nutrient solution containing glucose and β -alanine. EP 0 590 857 and US Patent 5,518,906 further show that after amplification of the pantothenic acid biosynthesis genes present on the plasmid pFV31 in the abovementioned strains there is improved production of D-pantoic acid in a nutrient solution containing glucose and improved production of D-pantothenic acid in a nutrient solution containing glucose and β -alanine.

WO 97/10340 additionally shows that pantothenic acid production can be further increased in *Escherichia coli* strains which form pantothenic acid by increasing the activity of the enzyme acetohydroxy acid synthase II, an enzyme of valine biosynthesis.

Object of the invention

The inventors have made it their object to provide new bases for improved processes for the production of pantothenic acid by fermentation.

Description of the invention

The vitamin pantothenic acid is a commercially important product which is used in cosmetics, medicine, human nutrition and livestock nutrition. There is thus a general interest in providing novel processes for the production of pantothenic acid.

Mention of D-pantothenic acid or pantothenic acid or pantothenate hereinafter mean not only the free acids but also the salts of D-pantothenic acid such as, for example, the calcium, sodium, ammonium or potassium salt.

The invention relates inter alia to a process for the production of D-pantothenic acid by fermentation using microorganisms which, in particular, already produce D-pantothenic acid, and in which the panD gene coding for L-aspartate 1-decarboxylase (E.C. 4.1.1.11) is amplified, in particular overexpressed, singly or in combination with the panB and/or panC genes. The invention further relates to corresponding recombinant DNA sequences as set forth in the claims. The invention likewise relates to processes for the production of D-pantothenic acid by fermentation using the improved microorganisms which produce D-pantothenic acid and have been prepared as claimed in claims 8 to 17.

The term "amplification" describes in this connection the increase in the intracellular activity of one or more enzymes in a microorganism which are encoded by the corresponding DNA, by, for example, increasing the copy number of the gene or genes, using a strong promoter or using a gene which codes for a corresponding enzyme with high activity and, where appropriate, combine these measures.

The microorganisms to which the present invention relates are able to produce pantothenic acid from glucose, sucrose, lactose, fructose, maltose, molasses, starch, cellulose or from glycerol and ethanol. They may be fungi or yeasts or Gram-positive bacteria, for example of the genus corynebacterium, or Gram-negative bacteria such as, for example, those of the enterobacteriaceae. In the case of the Enterobacteriaceae family, particular mention should be made of the genus Escherichia with the species Escherichia coli. Within the species Escherichia coli, mention should be made of the so-called K-12 strains such as, for example, the strains MG1655 or W3110 (Neidhard et al.: Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology (ASM Press, Washington D.C.)) or the Escherichia coli wild-type strain IFO3547 (Institute for Fermentation, Osaka, Japan) and mutants derived therefrom. In the case of the genus Corynebacterium, particular mention should be

made of the species *Corynebacterium glutamicum* which is well known among experts for its ability to produce amino acids. This species includes wild-type strains such as, for example, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 and mutants derived therefrom.

The inventors have found that microorganisms produce pantothenic acid in an improved manner after overexpression of the novel panD gene coding for L-aspartate 1-decarboxylase (E.C. 4.1.1.11), in particular from *Corynebacterium glutamicum*.

The inventors have additionally found that overexpression of the panD gene has advantageous effects in strains in which there is in addition overexpression of the panB and panC genes, which code for ketopantoate hydroxymethyltransferase and pantothenate synthetase, singly or together.

To achieve overexpression it is possible to increase the copy number of the corresponding genes, or the promoter and regulatory region located upstream of the structural gene can be mutated. Expression cassettes incorporated upstream of the structural gene act in the same way. Inducible promoters can additionally be used to increase expression during D-pantothenate formation by fermentation. Expression is likewise improved by measures to extend the lifespan of the m-RNA. The enzymic activity is likewise enhanced by preventing the breakdown of the enzyme protein. The genes or gene constructs can be either present in plasmids with varying copy number or integrated and amplified in the chromosome. It is further possible alternatively to achieve overexpression of the relevant genes by changing the medium composition and management of the culture.

Information on this is to be found by the skilled worker inter alia in Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), in Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya and Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), in Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in the European Patent EP 0 472 869, in US Patent 4,601,893, in Schwarzer and Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), in Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), or in LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in the Patent Application WO 96/15246, in Jensen and Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) or in the handbook "Manual of Methods for General Bacteriology of the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981). In addition, the skilled worker will find information inter alia in Chang and Cohen (Journal of Bacteriology 134:1141-1156 (1978)), in Hartley and Gregori (Gene 13:347-353 (1981)), in Amann and Brosius (Gene 40:183-190 (1985)), in de Broer et al. (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America 80:21-25 (1983)), in LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11, 187-193 (1993)), in

PCT/US97/13359, in Llosa et al. (Plasmid 26:222-224 (1991)), in Quandt and Klipp (Gene 80:161-169 (1989)), in Hamilton (Journal of Bacteriology 171:4617-4622 (1989)), in Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) and in well-known textbooks of genetics and molecular biology.

To isolate the panD gene or other genes such as, for example, the panB and panC genes of *C. glutamicum*, firstly a gene bank of this microorganism is set up in *E. coli*. The setting up of gene banks is set forth in generally known textbooks and handbooks. Mention may be made as example of the textbook by Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1990) or the handbook by Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). A well-known gene bank is that of the *E. coli* K-12 strain W3110, which was set up by Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) in λ vectors. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) describe a gene bank of *C. glutamicum* ATCC13032, which was set up with the aid of the cosmid vector SuperCos I. (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) in *E. coli* K-12 strain NM554.

(Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575). To produce a gene bank of *C. glutamicum* in *E. coli* it is also possible to use plasmids such as pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) or pUC9 (Viera et al., 1982, Gene 19:259-268). Particularly suitable hosts are those *E. coli* strains which are restriction and recombination deficient. One example thereof is the strain DH5 α mcr which was described by Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649),

The gene bank is subsequently incorporated into an indicator strain by transformation (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580, 1983) or electroporation (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347). The indicator strain is distinguished by having in the gene of interest a mutation which gives rise to a detectable phenotype, for example an auxotrophy. Of particular interest for the purpose of the present invention is the *E. coli* mutant DV9 (Vallari and Rock, Journal of Bacteriology 1985, 164:136-142), which harbors a mutation in the panD gene. Another example of a pantothenic acid-requiring *E. coli* mutant is the strain SJ2 which harbors a mutation in the panB gene and can be processed from the Genetic Stock Center of Yale University (New Haven, Connecticut, USA). After transformation of the indicator strain, such as, for example, of the panD mutant DV9, with a recombinant plasmid which harbors the gene of interest, such as, for example, the panD gene, and expression of the relevant gene, the indicator strain is prototrophic with regard to the corresponding property such as, for example, the pantothenic acid requirement. The gene or DNA fragment isolated in this way can be

characterized by determining the sequence as described, for example, in Sanger et al. (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977). The degree of identity with known genes present in databases such as, for example, GenBank (Benson et al., 1998, Nucleic Acids Research, 26:1-7) can then be analyzed by published methods (Altschul et al., 1990, Journal of Molecular Biology 215:403-410).

In this way, the novel *C. glutamicum* DNA sequence coding for the panD gene, which as SEQ ID NO 1 is a constituent of the present invention, was obtained. In addition, the amino acid sequences of the corresponding enzymes were derived from the available DNA sequence by the methods described above. This SEQ ID NO 2 depicts the resulting amino acid sequence of the panD gene product, namely of L-aspartate 1-decarboxylase. Also in this way, the novel *C. glutamicum* DNA sequence coding for the panB and panC gene, which as SEQ ID NO 3 is a constituent of the present invention, was obtained. SEQ ID NO 4 depicts the resulting amino acid sequence of the panB gene product, namely of ketopantoate hydroxymethyltransferase, and SEQ ID NO 5 depicts the resulting amino acid sequence of the panC gene product, namely of pantothenate synthetase.

Coding DNA sequences resulting from SEQ ID NO 1 and/or SEQ ID NO 3 due to the degeneracy of the genetic code are likewise a constituent of the invention. In the same way, DNA sequences which hybridize with SEQ ID NO 1 and/or SEQ ID NO 3 are a constituent of the invention. Among skilled workers moreover, conservative amino acid exchanges such as, for example, exchange of glycine for alanine or of aspartic acid for glutamic acid in proteins are known as sense mutations which lead to no fundamental change in the activity of the protein, i.e. are functionally neutral. It is also known that modifications at the N and/or C terminus of a protein may negligibly impair or even stabilize its function. Details on this are to be found by the skilled worker inter alia in Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)) in O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), in Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), in Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) and well-known text books of genetics and molecular biology. Amino acid sequences resulting in a corresponding manner from a SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4 and/or SEQ ID NO 5 are likewise a constituent of the invention.

The gene characterized in this way can then be expressed, singly or in combination with others, in a suitable microorganism. A well-known method for expression or overexpression of genes is to amplify them with the aid of plasmid vectors which may additionally be provided with expression signals. Suitable plasmid vectors are those which are able to replicate in appropriate microorganisms. Suitable examples for the present invention are for *Escherichia coli* the vectors pSC101

(Vocke and Bastia, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80 (21), 6557-6561 (1983)) or pKK223-3 (Brosius and Holy, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81, 6929 (1984)) and for *Corynebacterium glutamicum* the vector pEKEx1 (Eikmanns et al. Gene 102:93-98 (1991)) or pZ8-1 (European Patent 0 375 889). Examples of such microorganisms are the *C. glutamicum* strain ATCC 13032/pND-D2 and ATCC 13032/pND-DBC2 and the *E. coli* strain MG 1655/pND-D2, which contain the plasmids pND-D2 and pND-DBC2. Plasmid pND-D2 is an *E. coli*-*C. glutamicum* shuttle vector which is based on the plasmid pZ8-1 and harbors the panD gene of *C. glutamicum*. Plasmid pND-DBC2 is an *E. coli*-*C. glutamicum* shuttle vector which is based on the plasmid pZ8-1 and harbors the panD, panB and panC genes of *C. glutamicum*.

It is clear to the skilled worker that chromosomal mutations which bring about resistance to metabolites and antimetabolites or which prevent the outflow of precursors of pantothenic acid can advantageously be combined with the measures to which the invention relates.

The microorganisms produced according to the invention can be cultivated continuously or batchwise in a batch process or in a fed batch or repeated fed batch process in order to produce pantothenic acid. A summary of known cultivation methods is to be found in the textbook by Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) or the textbook by Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

The culture medium to be used must meet the requirements of the particular microorganisms in a suitable manner. Descriptions of culture media for various microorganisms are present in the handbook "Manual of Methods for General Bacteriology" of the American Society for Bacteriology (Washington D.C. USA, 1981). It is possible to use as source of carbon sugars and carbohydrates such as, for example, glucose, sucrose, lactose, fructose, maltose, molasses, starch or cellulose, oils and fats such as, for example, soybean oil, sunflower oil, peanut oil and coconut fat, fatty acids such as, for example, palmitic acid, stearic acid and linoleic acid, alcohols such as, for example, glycerol and ethanol and organic acids such as, for example, acetic acid. These substances can be used singly or as mixture. It is possible to use as source of nitrogen organic nitrogen-containing compounds such as peptones, yeast extract, meat extract, malt extract, corn steep liquor, soybean flour and urea or inorganic compounds such as ammonium sulfate, ammonium chloride, ammonium phosphate, ammonium carbonate and ammonium nitrate. The sources of nitrogen can be used singly or as mixture. It is possible to use as source of phosphorus, potassium dihydrogen phosphate or dipotassium hydrogen phosphate or a corresponding sodium-containing salt. The culture medium

must additionally contain salts of metals such as, for example, magnesium sulfate or iron sulfate, which are necessary for growth. Finally, it is possible to employ essential growth substances such as amino acids and vitamins in addition to the abovementioned substances. In addition to these, precursors of pantothenic acid such as aspartate, β -alanine, ketoisovalerate, ketopantoic acid or pantoic acid and, where appropriate, salts thereof can be added to the culture media for additionally increasing pantothenic acid production. Said starting materials can be added to the culture in the form of a single batch or be fed in during the cultivation in a suitable manner.

The pH of the culture is controlled by employing basic compounds such as sodium hydroxide, potassium hydroxide, ammonia or acidic compounds such as phosphoric acid or sulfuric acid in a suitable manner. Foaming can be controlled by employing antifoams such as, for example, fatty acid polyglycol esters. To maintain the stability of plasmids it is possible to add to the medium suitable substances having a selective effect, for example antibiotics. Aerobic conditions are maintained by introducing oxygen or oxygen-containing gas mixtures such as, for example, air into the culture. The temperature of the culture is normally 20°C to 50°C and preferably 25°C to 45°C. The culture is continued until pantothenic acid formation is at a maximum. This aim is normally achieved within 10 hours to 160 hours.

Strains which have a high activity of the enzyme L-aspartate 1-decarboxylase can also be employed to produce β -alanine from L-aspartate. It is possible to employ for this purpose fermentation processes, enzymatic transformation reactions or combinations of the two.

The concentration of pantothenic acid formed can be determined by known methods (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)).

The following microorganisms have been deposited at the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany) in accordance with the Budapest Treaty:

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032/pND-D2 as DSM 12438

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032/pND-DBC2 as DSM 12437

Examples

The present invention is explained in detail below by means of examples.

Example 1

Cloning and sequencing of the panD gene of *C. glutamicum*

1. Cloning of the panD gene

Chromosomal DNA from *C. glutamicum* ATCC 13032 was isolated as described in Tauch et al. (1995, Plasmid, 33:168-179) and partially cleaved with the restriction enzyme Sau3A (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description Sau3A, Code no. 27-0913-02). DNA fragments in a size range of 7-9 kb were isolated using the "Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids" (Macherey and Nagel, Düren, Germany; Cat. No. 740584) and ligated into the dephosphorylated BamHI cleavage site of the vector pUC19 (Norlander et al., 1982, Gene, 26:101-106), which was purchased from MBI Fermentas (Vilnius, Lithuania). The ligation was carried out as described by Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor), incubating the DNA mixture with T4 ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) overnight. This ligation mixture was then electroporated (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) into the *E. coli* strain DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academies of Sciences USA, 87:4645-4649) and plated out on LB agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 μ g/ml ampicillin. After incubating at 37°C for 24 hours it was possible to obtain the *C. glutamicum* gene bank by reisolating the plasmid DNA by the alkaline lysis method of Birnboim and Doly (Nucleic Acids Research, 7:1513-1523, 1979) from the transformants. This gene bank was used for electroporation of competent cells of the *E. coli* strain DV9 (Vallari and Rock, 1985, Journal of Bacteriology, 164:136-142) which harbors a mutation in the panD gene. The electroporation mixture was washed twice with medium E (Vogel and Bonner, 1956, Journal of Biological Chemistry, 218:97-106) following the regeneration phase (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347). The composition of medium E is shown in Table 1. These cells were used to inoculate 50 ml of medium E + 100 μ g/ml ampicillin, which were present in a 250 ml Erlenmeyer flask, and they were incubated in an air shaker at 250 rpm and 39°C. After incubation for two days, the bacterial suspension was diluted and streaked onto LB agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) supplemented with 100 μ g/ml ampicillin.

Table 1

Substance	Amount per liter	Note
K ₂ HPO ₄	10 g	
NaNH ₄ HPO ₄ · 4H ₂ O	3.5 g	
Citric acid	2 g	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g	
Glucose	4 g	sterilize separately
Thiamine	0.2 µg	sterilize by filtration

The plasmid DNA of a DV9 transformant was isolated, called pNIC-1.3 and characterized by agarose gel electrophoresis (Sambrook et al., Molecular cloning, A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) and comparison with standard DNA fragments of known length. Plasmid pNIC-1.3 contains a 7 kbp-long insert. The complementation ability of pNIC-1.3 was checked by renewed transformation of the panD mutant DV9. The resulting transformants were again able to grow in β-alanine-free medium E under the conditions indicated above.

Subcloning of the 7 kb insert took place by cleaving the plasmid pNIC-1.3 with the restriction enzymes BamHI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description BamHI, Code no. 27-0868-03), EcoRI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description EcoRI, Code no. 27-0884-03) and BglII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description BglII, Code no. 27-0946-02) and subsequently ligating into a vector pK18mob (Schäfer, 1994, Gene 145:69-73) which had been restriction-digested correspondingly. The resulting ligation mixture was electroporated into the E. coli panD mutant DV9; selection for complemented transformants took place as described above, the agar plates containing 50 µg/ml kanamycin in this case. The plasmids of complemented single clones were isolated and characterized by restriction analyses. An EcoRI subclone, called pNIC-10 hereinafter, with a DNA insert approximately 3 kb in size was selected for the following sequence analysis.

2. Sequencing of the panD gene

For the double-stranded sequencing of the 3 kb fragment of pNIC-10, the latter was cleaved with various restriction enzymes, and the fragments were subcloned into the plasmid pUC19 or pK18mob. The plasmid DNA employed for the sequencing was isolated in accordance with the manufacturer's instructions using

the "QIAGEN Plasmid Mini kit" (Qiagen, Inc., Chatsworth, Ca., USA), and the plasmid sizes were determined by agarose gel electrophoresis.

The sequencing took place by the dideoxy chain termination method of Sanger et al. (Proceedings of the National Academies of Sciences USA, 74:5453-5467, 1977) with the modifications of Zimmermann et al. (Nucleic Acids Research, 18:1067, 1990). The "Cy5-AutoRead Sequencing kit" of Pharmacia (Product No. 27-2690-02, Freiburg, Germany) was used. The gel electrophoretic fractionation and analysis of the sequencing reaction took place in a "Long Ranger Gel Solution" polyacrylamide gel (FMC BioProducts, Rockland, Me., USA) with the automatic laser fluorescence (A.L.F.) express DNA sequencing apparatus from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). The resulting crude sequence data were subsequently processed using the Staden program package (Nucleic Acids Research, 14:217-231, 1986) version 97-0. All the individual sequences of the pNIC-10 subclones were assembled to a coherent 3060 bp-long contig which was called contig 13. Computer-assisted coding region analysis using the XNIP program (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) of the complete DNA fragment resulted in identification of five open reading frames (ORFs).

A restriction map of contig 13 and the location of the ORFs referred to as orf-1 to orf-5 is shown in Figure 1. Homology analyses were carried out with the "BLAST search programs" (Gish and States, 1993, Nature Genetics 3:266-272; Altschul et al., 1990, Journal of Molecular Biology, 215:403-410) which was made available through the online service of the NCBI server of the "National Library of Medicine" (Bethesda, MD, USA). Analysis of contig 13 revealed that orf-3 is the panD gene. Hereinafter, orf-3 is referred to as panD. The nucleotide sequence of the DNA fragment harboring the panD gene is depicted as SEQ ID NO 1. The amino acid sequence of the panD gene product resulting from the above methods, namely L-aspartate 1-decarboxylase, is depicted as SEQ ID NO 2.

Example 2

Cloning and sequencing of the panB and panC genes from *C. glutamicum*

1. Cloning of the panB and panC genes

Chromosomal DNA of *C. glutamicum* ATCC 13032 was isolated as described by Schwarzer and Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) and cut with the restriction endonuclease Sau3A. After fractionation by gel electrophoresis, DNA fragments in a size range from 3 to 7 kb and from 9 to 20 kb were extracted and then ligated into the unique BamHI cleavage site of the vector pBR322. The ligation

mixtures were used to transform (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166 (1983) 557-580) the *E. coli* strain DH5 α mcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 87 (1990) 4645-4649). Insert-harboring colonies were identified on the basis of their tetracycline sensitivity after transfer to LB agar plates containing 10 μ g/ml tetracycline. Plasmid preparations (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) of combined clones resulted in the isolation of 8 groups which each contained 400 plasmids with an insert size of 9 to 20 kb and 9 groups which each contained 500 plasmids with an insert size of 3 to 7 kb. The *E. coli* panB mutant SJ2 (Cronan et al. 1982, Journal of Bacteriology 149: 916-922) was transformed with this gene bank by electroporation (Wehrmann et al. 1994, Microbiology 140: 3349-3356). The transformation mixtures were plated out directly onto CGXII medium with 15 g/l agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603). Plasmid DNA was isolated from clones able to grow without pantothenate supplementation (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). It was possible by retransformation to confirm the capability for heterologous complementation of the panB defect of the *E. coli* mutant SJ2 by 8 plasmids.

A restriction mapping of these 8 plasmids was carried out. One of the investigated plasmid vectors, called pUR1 hereinafter, contained an insert of 9.3 kb (Figure 2). Transformation of the *E. coli* panC mutant DV39 (Vallari and Rock 1985, Journal of Bacteriology 164: 136-142) revealed that the vector pUR1 was likewise able to complement the panC defect of this mutant.

2. Sequencing of the panB gene and of the panC gene

A fragment 2.2 kb in size of the insert (Figure 2) of pUR1 was sequenced by the dideoxy chain termination method of Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). For this purpose, initially subclones were generated using exonuclease III and were sequenced using standard primers (Universal and reverse primer supplied by Boehringer Mannheim, Germany). The sequencing mixtures underwent analysis by gel electrophoresis using the automatic laser fluorescence sequencing apparatus (A.L.F.) from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). The resulting nucleotide sequence was analyzed using the HUSAR program package (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB). The nucleotide sequence is depicted as SEQ ID NO 3. Analysis resulted in identification of two open reading frames. One open reading frame with a length of 813 bp which was identified as the panB gene codes for a polypeptide of 271 amino acids and is depicted as SEQ ID NO 4. The

second open reading frame, which was identified as the panC gene, comprises 837 base pairs. It codes for a polypeptide of 279 amino acids and is depicted as SEQ ID NO 5.

Example 3

Construction of vectors for expression of panD, panBC and panDBC

The pantothenate biosynthesis genes from *C. glutamicum* and *E. coli* were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) and synthetic oligonucleotides. The PCR experiments were carried out using the Taq DNA polymerase supplied by Gibco-BRL (Eggestein, Germany) in a PCT-100 thermocycler (MJ Research Inc., Watertown, Mass., USA). A single denaturation step of 2 minutes at 94°C was followed by a denaturation step of 90 seconds at 94°C, an annealing step for 90 seconds at a primer-dependent temperature of T=(2AT+4GC) -5°C (Suggs, et al., 1981, p. 683-693, In: D. D. Brown, and C. F. Fox (Eds), Developmental biology using purified genes. Academic Press, New York, USA) and an extension step lasting 90 seconds at 72°C. The last three steps were repeated cyclically 35 times, and the reaction was completed by a final extension step lasting 10 minutes at 72°C. The products amplified in this way were, after they had been checked by electrophoresis in an agarose gel, ligated into the vector pCR®2.1 (Original TA cloning kit, Invitrogen (Leek, the Netherlands), product description Original TA Cloning® Kit, Cat. no. KNM2030-01) following the manufacturer's information, and then transformed into the *E. coli* strain TOP 10F'. Transformants were selected by incubation at 37°C for 24 hours on LB agar plates with 100 µg/ml ampicillin and 40 µg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside).

Starting from the nucleotide sequences of the pantothenate biosynthesis genes panD (SEQ ID NO 1) and panBC (SEQ ID NO 3) of *C. glutamicum* ATCC 13032 and of *E. coli* K12 (W.K. Merkel and B.P. Nichols, 1993, GenBank: L17086), PCR primers were synthesized (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). These primers were selected so that the amplified fragments contained the genes and their natural ribosome binding sites but not possible promoter regions. In addition, suitable restriction cleavage sites were inserted to make cloning into the target vector possible. The sequences of the PCR primers, the inserted cleavage sites (sequence underlined) and the amplified gene (fragment size in bp is stated in parentheses) are listed in Table 2 below.

Table 2

Primer	Sequence with restriction cleavage site	Product	Plasmid
panD-Ec1	5'- <u>GAATT</u> CACAGGGTAGAAAGGTAGA-3' EcoRI	panD _{E.c.}	pND-D1
panD-Ec2	5'- <u>AGAT</u> CTGGATAACAATCAAGCAACC-3' BglII	(462 bp)	
panD-Cg1	5'-CATCTCACGCTAT <u>GAATT</u> CT-3' EcoRI	panD _{C.g.}	pND-D2
panD-Cg2	5'-ACGAGGC <u>CTGCAG</u> CAATA-3' PstI	(405 bp)	
panBC-E1	5'- <u>GGATCCC</u> CACAAACATCAATTATCAGG-3' BamHI	panBC _{E.c.}	pND-BC1
panBC-E2	5'- <u>GGATCC</u> TTAACGTATTACGCCAGCTC-3' BamHI	(1700 bp)	
panBC-C1	5'- <u>GTCGACT</u> CTGAGCTGGTCATCACATC-3' Sall	panBC _{C.g.}	pND-BC2
panBC-C2	5'- <u>GTCGAC</u> ACGCAGGGTTGGTACTAGAG-3' Sall	(1700 bp)	

The basic vector employed for expression both in *C. glutamicum* and in *E. coli* was the *E. coli*-*C. glutamicum* shuttle expression vector pZ8-1 (European Patent 0 375 889) depicted in Figure 3. The amplicons which had previously been cloned into the vector pCR®2.1 were ligated, by means of the primer-inserted restriction cleavage sites, into the expression vector pZ8-1 which had been treated in the same way, and were thus brought under the control of the tac promoter present in this plasmid. The only exception is the amplicon panD_{E.c.}, where the EcoRI-BglII fragment was cloned into the compatible EcoRI-BamHI restriction ends of the vector pZ8-1. The respective plasmid names for the expression plasmids constructed in this way are indicated in Table 2. The expression vector pZ8-1 with the panD_{E.c.} gene of *E. coli* is called pND-D1, and pZ8-1 with the panD_{C.g.} gene of *C. glutamicum* is called pND-D2. Correspondingly, the expression plasmids which contain panBC_{E.c.} and panBC_{C.g.} are called pHD-BC1 and pND-BC2 respectively. By way of example, the strategy for cloning the panD_{E.c.} and panD_{C.g.} genes into the vector of pZ8-1 is depicted in Figure 3. Correct cloning of all the expression plasmids was checked by sequencing the respective inserts.

In addition, both with the *E. coli* and with the *C. glutamicum* panD genes, an artificial panDBC operon was constructed. For the *E. coli* operon, the panD_{E.c.}-

containing vector pCR2.1 was cleaved with EcoRI, the DNA was fractionated in an agarose gel, and the panD fragment was purified from the gel as already described in Example 1.1 using the "Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids" (Machery and Nagel, Düren, Germany). The fragment was then ligated into the EcoRI-cleaved plasmid pND-BC1. Plasmids with a correct orientation of the panD gene were obtained by transforming the ligation mixture into the panD-auxotrophic *E. coli* strain DV9, and the latter was selected for complementation of the auxotrophy as described in Example 1. Plasmid DNA of the complemented mutants was isolated and correct arrangement of the gene was confirmed by partial sequencing of the insert of the plasmid called pND-DBC1 (Figure 4).

The procedure for constructing the *C. glutamicum* panDBC operon was similar. The panD_{C.g.}-containing vector pCR2.1 was cleaved with EcoRI, by which means the panD_{C.g.} gene was cleaved out of the vector on the one hand via the primer-internal and on the other hand via a vector EcoRI cleavage site. This gene fragment was purified and then cloned into the EcoRI cleavage vector pZ8-1, and plasmids with the correct panD orientation, called pND-D4, were obtained and checked as described above. The plasmid pND-D4 was then cleaved with the restriction enzyme Sall and ligated to the purified panBC fragment, which was obtained by Sall digestion (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description Sall Code No. 27-0882-01) of the plasmid pND-BC2. The electroporation mixture was electroporated into the *E.coli* strain DH5 α MCR, and the 10 plasmids with the panDBC gene arrangement were identified by restriction analyses. The correct gene arrangement of one of these plasmids, which was called pND-DBC2 (Figure 4), was verified by sequence analysis.

The expression vector pZ8-1, and the constructs pND-D1, pND-D2 and pND-DBC1 derived from this plasmid, were transformed into the *E. coli* strain MG1655, and transformants were selected on LB agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 50 μ g/ml kanamycin. The resulting strains were called MG1655/pZ8-1, MG1655/pND-D1, MG1655/pND-D2 and MG1655/pND-DBC1.

Electroporation of the plasmids pZ8-1, pND-D1, pND-D2 and pND-DBC2 into the *C. glutamicum* strain ATCC13032 and subsequent selection on LB agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 25 μ g/m; kanamycin resulted in the strains ATCC13032/pZ8-1, ATCC13032/pND-D1, ATCC13032/pND-D2 and ATCC13032/pND-DBC2.

Example 4

Formation of pantothenate by various *E. coli* K12 strains

Quantitative determination of D-pantothenate took place using the *Lactobacillus plantarum* pantothenate assay (test strain: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, Cat. No. 3211-30-3; culture medium: Bacto Pantothenate Assay medium (DIFCO Laboratories, Michigan, USA), Cat. No. 0604-15-3. This indicator strain can grow only in the presence of pantothenate in the stated culture medium, and the growth shows a linear dependence, which can be measured by photometry, on the pantothenate concentration in the medium. The hemicalcium salt of pantothenate was employed for the calibration (Sigma, product number P 2250). The optical density was determined in an LKB Biochrom Photometer from Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany) at a measurement wavelength of 580 nm (O.D.₅₈₀).

For pantothenate production of the *E. coli* strains MG1655/pZ8-1, MG1655/pND-D1, MG1655/pND-D2 and MG1655/pND-DBC1, 50 ml of test medium (medium E with 50 µg/ml kanamycin) were inoculated from a 16 hour-old culture of the same medium with an O.D.₅₈₀ of 0.1. After incubating these cultures at 37°C and 250 rpm for 5 and 72 hours, the cells were pelleted by centrifugation at 5000 × g for 10 minutes. The resulting cell-free supernatant was sterilized by filtration and stored at 4°C until quantification of pantothenate.

The quantification of the D-pantothenate in the culture supernatant took place using *L. plantarum* ATCC 8014 as stated in the DIFCO handbook (DIFCO MANUAL, 10th Edition, pp. 1100-1102; Michigan, USA). The results of these measurements are shown in Table 3.

Table 3

Strain	Gene	OD ₅₈₀ and pantothenate accumulation (µg/ml)			
		5 h		72 h	
		OD ₅₈₀	Pan.	OD ₅₈₀	Pan.
MG1655/pZ8-1	-	2.0	0.30	2.3	1.47
MG1655/pND-D1	panD _{E.c.}	2.3	0.90	2.5	6.95
MG1655/pND-DBC1	PanDBC _{E.c.}	2.0	0.96	2.0	6.96
MG1655/pND-D2	panD _{C,g.}	2.2	4.07	2.3	9.22

Example 5

Formation of pantothenate by various *C. glutamicum* strains

The formation of pantothenate by the *C. glutamicum* strains ATCC13032/pZ8-1, ATCC13032/pND-D1, ATCC13032/pND-D2 and *C. glutamicum* ATCC13032/pND-DB2 was checked in the medium CGXII (Keilhauer et al., 1993, Journal of Bacteriology, 175:5595-5603; Table 4) supplemented with 25 µg/ml kanamycin. This medium is called *C. glutamicum* test medium hereinafter. 50 ml portions of *C. glutamicum* test medium were inoculated from a 16 hour-old culture of the same medium with an OD₅₈₀ of 0.1. After incubation at 30°C and 150 rpm for 48 hours, the cells were removed by centrifugation at 5000 × g for 10 minutes, the supernatant was sterilized by filtration, and the pantothenate concentration was determined as described in Example 4. The results of pantothenate production by the various strains of *C. glutamicum* are summarized in Table 5.

Substance	Amount per liter	Note
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g	
Urea	5 g	
KH ₂ PO ₄	1 g	
K ₂ HPO ₄	1 g	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25 g	
MOPS	42 g	
CaCl ₂	10 mg	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg	
MnSO ₄ · H ₂ O	10 mg	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1 mg	
CuSO ₄	0.2 mg	
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.02 mg	
Biotin	0.5 mg	
Glucose	40 g	autoclave separately
Proctocatechic acid	0.03 mg	sterilize by filtration

Table 5

Strain	Gene	Pantothenate ($\mu\text{g/ml}$)	
		OD ₅₈₀	Pan.
ATCC13032/pZ8-1	-	21	0.19
ATCC13032/pND-D1	panD _{E.c.}	20	0.32
ATCC13032/pND-D2	panD _{C.g.}	19	1.78
ATCC13032/pND-DBC2	panDBC _{C.g.}	20	2.60

Figures

The following figures are appended:

- Figure 1: map of contig 13 with orf-1- orf-5
- Figure 2: map of the cloned DNA fragment present in pUR1, and indication of the location of the sequenced DNA section
- Figure 3: map of the plasmids pZ8-1, pND-D1 and pND-D2
- Figure 4: map of the plasmids pND-DBC1 and pND-DBC2

The abbreviations used in the figures have the following meaning:

rrnBT1T2	transcription terminator of the rrnB gene
Ptac:	tac promoter
panB:	encoding region of the panB gene
panC:	encoding region of the panC gene
panD:	encoding region of the panD gene
rep-C.g.:	DNA region for replication in <i>C. glutamicum</i>
oriV-E.c.:	origin for vegetative transfer in <i>E. coli</i>
kan:	kanamycin resistance gene
EcoRI:	cleavage site for the restriction enzyme EcoRI
E:	cleavage site for the restriction enzyme EcoRI
BamHI:	cleavage site for the restriction enzyme BamHI
B:	cleavage site for the restriction enzyme BamHI
BglII:	cleavage site for the restriction enzyme BglII
Clal:	cleavage site for the restriction enzyme Clal
H:	cleavage site for the restriction enzyme HindIII
Ncol:	cleavage site for the restriction enzyme Ncol
NruI:	cleavage site for the restriction enzyme NruI
Nsil:	cleavage site for the restriction enzyme NsiI

P: cleavage site for the restriction enzyme PstI
PstI: cleavage site for the restriction enzyme PstI
Pvul: cleavage site for the restriction enzyme Pvul
Sacl: cleavage site for the restriction enzyme Sacl
Sall: cleavage site for the restriction enzyme Sall
Scal: cleavage site for the restriction enzyme Scal
SphI: cleavage site for the restriction enzyme SphI
X: cleavage site for the restriction enzyme XbaI
Xhol: cleavage site for the restriction enzyme Xhol

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: Degussa Aktiengesellschaft
- (B) STREET: Weissfrauenstr. 9
- (C) CITY: Frankfurt am Main
- (D) FEDERAL STATE: Hesse
- (E) COUNTRY: Germany
- (F) POSTAL CODE: D-60311

(ii) TITLE OF INVENTION: Process for the production of D-pantothenic acid by fermentation through amplification of the panD gene in microorganisms

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 5

(iv) COMPUTER-READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version # 1.30 (EPO)

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 540 base pairs
- (B) TYPE: nucleotide
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: genomic DNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Corynebacterium glutamicum

(B) STRAIN: ATCC13032

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 77..484

(D) OTHER INFORMATION: /codon_start = 77

/EC_number = 4.1.1.11

/product = "L-aspartate 1-decarboxylase"

/gene = "panD"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

AATATTCCCTT	TCCTTGTCA	CTCACGCTAT	GATTTCTAAA	ACTTGAGGA	CAACCCCCAT	60
AAGGACACCA	CAGGAC	ATG CTG CGC ACC ATC CTC GGA AGT AAG ATT CAC				109
		Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His				
		1	5		10	
CGA GCC ACT GTC ACT CAA GCT GAT CTA GAT TAT GTT GGC TCT GTA ACC						157
Arg Ala Thr Val Thr Gln Ala Asp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr						
15	20	25				
ATC GAC GCC GAC CTG GTT CAC GCC GGC TTG ATC GAA GGC GAA AAA						205
Ile Asp Ala Asp Leu Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys						
30	35	40				
GTT GCC ATC GTA GAC ATC ACC AAC GGC GCT CGT CTG GAA ACT TAT GTC						253
Val Ala Ile Val Asp Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val						
45	50	55				
ATT GTG GGC GAC GCC GGA ACG GGC AAT ATT TGC ATC AAT GGT GCC GCT						301
Ile Val Gly Asp Ala Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala						
60	65	70	75			
GCA CAC CTT ATT AAT CCT GGC GAT CTT GTG ATC ATC ATG AGC TAC CTT						349
Ala His Leu Ile Asn Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu						
80	85	90				
CAG GCA ACT GAT GCG GAA GCC AAG GCG TAT GAG CCA AAG ATT GTG CAC						397
Gln Ala Thr Asp Ala Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His						
95	100	105				
GTG GAC GCC GAC AAC CGC ATC GTT GCG CTC GGC AAC GAT CTT GCG GAA						445
Val Asp Ala Asp Asn Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu						
110	115	120				
GCA CTA CCT GGA TCC GGG CTT TTG ACG TCG AGA AGC ATT TAGCGTTTA						494
Ala Leu Pro Gly Ser Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile						
125	130	135				
GCTCCCCAAT ATTGCTGCCG GCCTCGTTGA AAATGGTCAT GGTGGC						540

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 136 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His Arg Ala Thr Val Thr
1 5 10 15

Gln Ala Asp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr Ile Asp Ala Asp Leu
20 25 30

Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys Val Ala Ile Val Asp
35 40 45

Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val Ile Val Gly Asp Ala
50 55 60

Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala Ala His Leu Ile Asn
65 70 75 80

Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu Gln Ala Thr Asp Ala
85 90 95

Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His Val Asp Ala Asp Asn
100 105 110

Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu Ala Leu Pro Gly Ser
115 120 125

Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile
130 135

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 2164 base pairs
- (B) TYPE: nucleotide
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: genomic DNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTISENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Corynebacterium glutamicum
- (B) STRAIN: ATCC13032

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 351..1163
- (D) OTHER INFORMATION: /codon_start = 351
/EC_number = 4.1.2.12
/product = "ketopantoate hydroxymethyltransferase"
/gene = "panB"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: 1166..2002
- (D) OTHER INFORMATION: /codon_start = 1166
/EC_number = 6.3.2.1
/product = "pantothenate synthetase"
/gene = "panC"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

GCTTCGGGGT ACCAATTCT TTAAGAACCA TCAGATCAA	CTGTTGTACA TTCTCGGCCA	60		
GATTCA	GCTT	TTCGGTAAGG ACGAAACACT	TTCACTTGAA TCGGCAGCAA AGTTTCTTAA	120
AGTTTCTAAG GCAACTGCAA CGAGGTATTT TAGAACTCTC CGAGAAATGG	AATTAGTTCA	180		
CGAGGTCAGC AAACGCCCT	TGCGGTTTGC GCTCACGGAT AAAGGTCTG	AGATAGTAGG	240	
TCTTGAGGT	AAATTTGAC TCCATAACGA GAACTTAATC GAGCAACACC CCTGAACAGT	300		
GAATCAAATC GGAATT	TATTCTGAGC TGGTCATCAC ATCTATACTC ATG CCC	356		
		Met Pro		

ATG TCA GGC ATT GAT GCA AAG AAA ATC CGC ACC CGT CAT TTC CGC GAA Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe Arg Glu 140 145 150	404
GCT AAA GTA AAC GGC CAG AAA GTT TCG GTT CTC ACC AGC TAT GAT GCG Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr Asp Ala 155 160 165 170	452
CTT TCG GCG CGC ATT TTT GAT GAG GCT GGC GTC GAT ATG CTC CTT GTT Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu Leu Val 175 180 185	500
GGT GAT TCC GCT GCC AAC GTT GTG CTG GGT CGC GAT ACC ACC TTG TCG Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr Leu Ser 190 195 200	548
ATC ACC TTG GAT GAG ATG ATT GTG CTG GCC AAG GCG GTG ACG ATC GCT Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr Ile Ala 205 210 215	596
ACG AAG CGT GCG CTT GTG GTG GTT GAT CTG CCG TTT GGT ACC TAT GAG Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr Tyr Glu 220 225 230	644
GTG AGC CCA AAT CAG GCG GTG GAG TCC GCG ATC CCG GTC ATG CGT GAA Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met Arg Glu 235 240 245 250	692
ACG GGT GCG GCT GCG GTG AAG ATC GAG GGT GGC GTG GAG ATC GCG CAG Thr Gly Ala Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile Ala Gln 255 260 265	740
ACG ATT CGA CGC ATT GTT GAT GCT GGA ATT CCG GTT GTC GGC CAC ATC Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly His Ile 270 275 280	788
GGG TAC ACC CCG CAG TCC GAG CAT TCC TTG GGC GGC CAC GTG GTT CAG Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val Val Gln 285 290 295	836
GCT CGT GGC GCG AGT TCT GGA AAG CTC ATC GCC GAT GCC CGC GCG TTG Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg Ala Leu 300 305 310	884
CAG CAG GCG GGT GCG TTT GCG GTT GTG TTG GAG ATG GTT CCA GCA GAG Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro Ala Glu 315 320 325 330	932
GCA GCG CGC GAG GTT ACC GAG GAT CTT TCC ATC ACC ACT ATC GGA ATC Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile Gly Ile 335 340 345	980
GGT GCC GGC AAT GGC ACA GAT GGG CAG GTT TTG GTG TGG CAG GAT GCC Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln Asp Ala 350 355 360	1028
TTC GGC CTC AAC CGC GGC AAG AAG CCA CGC TTC GTC CGC GAG TAC GCC Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu Tyr Ala 365 370 375	1076
ACC TTG GGC GAT TCC TTG CAC GAC GCC GCG CAG GCC TAC ATC GCC GAT Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile Ala Asp 380 385 390	1124

ATC CAC GCG GGT ACC TTC CCA GGC GAA GCG GAG TCC TTT TA ATG CAG Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe Met Gln 395 400 405 1	1171
GTA GCA ACC ACA AAG CAG GCG CTT ATC GAC GCC CTC CTC CAC CAC AAA Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His His Lys 5 10 15	1219
TCC GTC GGC CTC GTC CCC ACC ATG GGT GCG CTA CAC AGC GGA CAC GCC Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly His Ala 20 25 30	1267
TCG TTG GTT AAA GCA GCA CGC GCT GAA AAC GAC ACT GTT GTA GCC AGT Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val Ala Ser 35 40 45 50	1315
ATT TTT GTC AAT CCC CTG CAG TTT GAA GCA CTC GGT GAT TGC GAT GAT Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys Asp Asp 55 60 65	1363
TAC CGC AAC TAT CCC CGC CAA CTC GAC GCC GAT TTA GCA CTG CTT GAA Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu Leu Glu 70 75 80	1411
GAG GCA GGT GTG GAT ATT GTG TTC GCA CCC GAT GTG GAG GAA ATG TAC Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu Met Tyr 85 90 95	1459
CCC GGT GGC TTG CCA CTA GTG TGG GCG CGC ACC GGT TCC ATC GGA ACA Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile Gly Thr 100 105 110	1507
AAA TTG GAG GGT GCC AGC AGG CCT GGC CAT TTC GAT GGT GTG GCT ACC Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val Ala Thr 115 120 125 130	1555
GTG GTG GCG AAC CTG TTC AAT TTG GTG CGC CCT GAT CGT GCA TAT TTT Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala Tyr Phe 135 140 145	1603
GGA CAA AAA GAT GCT CAG CAG GTT GCG GTG ATT CGG CGA TTG GTT GCC Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu Val Ala 150 155 160	1651
GAT CTA GAC ATT CCC GTG GAG ATT CGT CCC GTT CCG ATT ATT CGT GGC Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile Arg Gly 165 170 175	1699
GCC GAT GGC TTA GCC GAA TCC AGC CGC AAT CAA CGT CTT TCT GCG GAT Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser Ala Asp 180 185 190	1747
CAG CGA CCG CAA GCT CTG GTG CTG CCG CAG GTG TTG AGT GGG TTG CAG Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly Leu Gln 195 200 205 210	1795
CCT CGA AAA GCA GCT GGT GAA GCG CTA GAT ATC CAA GGT GCG CGC GAC Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala Arg Asp 215 220 225	1843
ACC TTG GCC AGC GCC GAC GGC GTG CGC TTG GAT CAC CTG GAA ATT GTC Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu Ile Val 230 235 240	1891
GAT CCA CCC ACC CTC GAA CCA TTA GAA ATC GAC GGC CTG CTC ACC CAA Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu Thr Gln 245 250 255	1939

CCA CGG TTG GTG GTC GGC GCG ATT TTC GTG GGG CCG GTG CGG TTG ATC Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg Leu Ile 260 265 270	1987
GAC AAT ATC GAG CTC TAGTACCAAC CCTGGTGTGC AGCACGCAGC TTTCGCATAAC Asp Asn Ile Glu Leu 275	2042
GCGTGCTCAG CTCAGTGTTC TTACGTGCGC GGTGGGGATC GGAACCCGGGA GTTGGCCACT GCGGTGGCGT CCCCTCACCC GACAGCGCCC ATGCCGCCTG ACGAGCTGCA CCCAACGCCA CA	2102 2162 2164

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 271 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

Met Pro Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe
1 5 10 15

Arg Glu Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

Asp Ala Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu
35 40 45

Leu Val Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr
50 55 60

Leu Ser Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr
65 70 75 80

Ile Ala Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr
85 90 95

Tyr Glu Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met
100 105 110

Arg Glu Thr Gly Ala Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile
115 120 125

Ala Gln Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly
130 135 140

His Ile Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val
145 150 155 160

Val Gln Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg
165 170 175

Ala Leu Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro
180 185 190

Ala Glu Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile
195 200 205

Gly Ile Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln
210 215 220

Asp Ala Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu
225 230 235 240

Tyr Ala Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile
245 250 255

Ala Asp Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe
260 265 270

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 279 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

Met Gln Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His
1 5 10 15

His Lys Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly
20 25 30

His Ala Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val
35 40 45

Ala Ser Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys
50 55 60

Asp Asp Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu
65 70 75 80

Leu Glu Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu
95 90

Met Tyr Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile
100 105 110

Gly Thr Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val
115 120 125

Ala Thr Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala
130 135 140

Tyr Phe Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu
145 150 155 160

Val Ala Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile
165 170 175

Arg Gly Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser
180 185 190

Ala Asp Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly
195 200 205

Leu Gln Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala
210 215 220

Arg Asp Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu
225 230 235 240

Ile Val Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu
245 250 255

Thr Gln Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg
260 265 270

Leu Ile Asp Asn Ile Glu Leu
275

Patent claims

1. DNA which is capable of replication in microorganisms of the genera *Corynebacterium* and *Escherichia* and is recombinant where appropriate and which contains a nucleotide sequence coding for aspartate 1-decarboxylase.
2. Replicable DNA as claimed in claim 1, whose nucleotide sequence codes for *panD* originating from a *Corynebacterium*, whose location is depicted in Fig. 1.
3. Replicable DNA as claimed in claim 2, having:
 - (i) the nucleotide sequence shown in SEQ ID No. 1 which codes for *panD*, or
 - (ii) a sequence which corresponds to the sequence (i) within the range of the degeneracy of the genetic code; or
 - (iii) a sequence which hybridizes with a sequence complementary to the sequence (i) or (ii), and, where appropriate,
 - (iv) functionally neutral sense mutations in (i).
4. A microorganism, in particular of the genus *Corynebacterium* or *Escherichia*, transformed by the introduction of the replicable DNA as claimed in any of claims 1 to 3.
5. The plasmid vector pND-D2, characterized by the restriction map depicted in Figure 2, deposited as *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032/pND-D2 under the number DSM 12438.
6. The plasmid vector pND-DBC2, characterized by the restriction map depicted in Figure 4, deposited as *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032/pND-DBC2 under the number DSM 12437.
7. A process for the production of D-pantothenic acid by replication (overexpression) of the *panD* gene and, where appropriate, other nucleotide sequences coding for aspartate 1-decarboxylase in microorganisms, and employing these microorganisms for fermentation.

8. A process as claimed in claim 7, wherein the amplification is achieved by increasing the copy number of the genes or nucleotide sequences in by transformation of microorganisms with plasmid vectors harboring these genes or nucleotide sequences, or by chromosomal amplification.
9. A process as claimed in claim 7, wherein the overexpression is achieved by mutating the promoter and regulatory region located upstream of the structural gene.
10. A process as claimed in claim 7, wherein the overexpression is achieved by incorporating expression cassettes upstream of the structural gene.
11. A process as claimed as claim 7, wherein the expression of the panD gene in the microorganisms is improved by extending the life span of the corresponding mRNA and/or preventing the breakdown of the relevant enzyme protein.
12. A process as claimed in claims 8 to 11, wherein the panD gene is overexpressed in microorganisms which have further metabolite and/or antimetabolite resistance mutations.
13. A process as claimed in claims 8 to 12, wherein the overexpression is achieved by fermenting the microorganisms in altered culture media and/or altering the management of the fermentation.
14. A process as claimed in claims 8 to 13, wherein there is use of microorganisms in which the metabolic pathways which reduce pantothenate (pantothenic acid) formation are at least partly eliminated.
15. A process as claimed in claims 8 to 14, wherein there is use of microorganisms in which, in addition to the panD gene, there is amplification (overexpression) of the other genes of the metabolic pathway for pantothenate formation, singly or together.
16. A process as claimed in claim 15, wherein there is use of microorganisms in which there is amplification (overexpression) of one or more of the genes which code for the enzymes ketopantoate hydroxymethyltransferase (EC

4.1.2.12) and pantothenate synthetase (EC 6.3.2.1), in addition to the panD gene, in particular with a *Corynebacterium* origin.

17. A process as claimed in claims 15 and 16, wherein there is use of microorganisms transformed with various compatible plasmid vectors containing said genes singly.
18. A process as claimed in claims 15 and 16, wherein there is use of a strain transformed with a plasmid vector, and the plasmid vector harbors one or more of said genes, including the panD gene, in which the genes are arranged consecutively and are under the control of a common promoter or are arranged separate from one another and are under the control of different promoters.
19. A process as claimed in claim 17, wherein there is use of microorganisms transformed with the plasmid vector pND-D2.
20. A process as claimed in claim 17, wherein there is use of microorganisms transformed with the plasmid vector pND-DBC2.
21. A process for the production of pantothenic acid which comprises carrying out the following steps:
 - a) fermentation of microorganisms as claimed in one or more of the preceding claims, in which there is amplification (overexpression) of at least the panD gene, where appropriate in combination with the panB and/or panC gene,
 - b) concentration of the pantothenic acid in the medium or in the cells of the microorganisms and
 - c) isolation of the pantothenic acid.
22. A process as claimed in claim 21, wherein the overexpressed genes derive from microorganisms of the genus *Corynebacterium*.
23. A process as claimed in claim 21 or 22, wherein in the stage a) there is addition of a precursor of pantothenic acid selected from the group of aspartate, β -alanine, ketoisovalerate, ketopantoate or pantoate.

24. A process as claimed in one or more of the preceding claims, wherein there is use of microorganisms of the genus Escherichia or Corynebacterium.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Method for the fermentative production of D- pantothenic acid by amplification of the panD gene of microorganisms

Patent Number: EP1006192
Publication date: 2000-06-07
Inventor(s): KALINOWSKI JOERN DR (DE); DUSCH NICOLE DR (DE); PUEHLER ALFRED PROF DR (DE)
Applicant(s):: DEGUSSA (DE)
Requested Patent: EP1006192
Application Number: EP19990122650 19991113
Priority Number(s): DE19981055313 19981201
IPC Classification: C12N15/60 ; C12N15/54 ; C12N15/77 ; C12P13/02 ; C12N1/21
EC Classification: C12N9/88, C12N15/52, C12P13/02
Equivalents: CN1256314, DE19855313

Abstract

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2